

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS
Departamento de Química Física I



**NUEVAS ESTRATEGIAS SOSTENIBLES PARA LA SÍNTESIS
ENZIMÁTICA DE OLIGOSACÁRIDOS Y
GLYCOCONJUGADOS DE INTERÉS BIOLÓGICO**

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR**

Manuel Andrés Sandoval Barrantes

Bajo la dirección de la doctora

María José Hernaiz Gómez-Dégano

Madrid, 2013

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA FÍSICA I
PROGRAMA DE DOCTORADO EN QUÍMICA SOSTENIBLE

**“NUEVAS ESTRATEGIAS SOSTENIBLES PARA LA SÍNTESIS
ENZIMÁTICA DE OLIGOSACÁRIDOS Y GLICOCONJUGADOS
DE INTERÉS BIOLÓGICO”**



TESIS DOCTORAL

Por:

MANUEL ANDRÉS SANDOVAL BARRANTES

Realizada en el Departamento de Química Orgánica y Farmacéutica
Facultad de Farmacia

Directora: Dra. María José Hernaiz Gómez-Dégano

Madrid, Mayo 2012



Prof. Dra. D. María J. Hernáiz
Grupo de Biotransformaciones
Departamento de Química Orgánica y Farmacéutica
Facultad de Farmacia, Universidad Complutense
Ciudad Universitaria, Plaza de Ramón y Cajal, s/n.
E-28040 MADRID, ESPAÑA
Tel. nº. +34-913941821. Fax nº. +34-913941822.
E-mail: mjhernai@farm.ucm.es
Web page: www.biotransformaciones.com

GRUPO DE BIOTRANSFORMACIONES

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ORGÁNICA Y FARMACÉUTICA

Dña. María José Hernaiz Gómez-Dégano, profesora titular de la Universidad Complutense de Madrid adscrita al Departamento de Química Orgánica y Farmacéutica de la Facultad de Farmacia, con número de registro personal 7034455146 AO 504, en su calidad de DIRECTORA

HACE CONSTAR:

Que el trabajo presentado por D. Manuel Andrés Sandoval Barrantes para aspirar al título de Doctor con título: **“NUEVAS ESTRATEGIAS SOSTENIBLES PARA LA SÍNTESIS ENZIMÁTICA DE OLIGOSACÁRIDOS Y GLICOCONJUGADOS DE INTERÉS BIOLÓGICO”**, presenta la calidad suficiente para ser defendido. El trabajo ha sido realizado en los laboratorios del Departamento de Química Orgánica y Farmacéutica de la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense. Este trabajo aporta nuevos conocimientos al campo de estudios de la síntesis enzimática de oligosacáridos y glicoconjugados, utilizando condiciones sostenibles. En la presente tesis el doctorando ha realizado un estudio con enzimas mesófilas y termófilas, se ha analizado el efecto de distintos disolventes en el medio de reacción y se han realizado ensayos de inmovilización con algunas enzimas.

Por todo ello informo favorablemente la mencionada Tesis Doctoral, por lo que bajo mi opinión procede la exposición y defensa de la misma.

Fdo. María José Hernaiz Gómez-Dégano
Profesora Titular de la Universidad Complutense de Madrid

Parte de los resultados que se presentan en esta memoria han sido expuestos en diferentes congresos nacionales e internacionales y han dado lugar a las siguientes publicaciones:

Publicaciones:

Sandoval, M.; Ferreras, E.; Pérez-Sánchez, M.; Berenguer, J.; Sinisterra, J.V.; Hernaiz, M. J. Screening of strains and recombinant enzymes from *Thermus thermophilus* for their use in disaccharide synthesis. J. Mol. Catal. B: Enzym. 2012, 74, 162-169.

Sandoval, M.; Civera, C.; Treviño, J.; Ferreras, E.; Cortés, A.; Vaultier, M.; Berenguer, J.; Lozano, P.; Hernaiz, M. J. Efficient and selective enzymatic synthesis of *N*-Acetyl-Lactosamine in ionic liquid: a rational explanation. RSC Adv. In press. DOI:10.1039/C2RA20618H

Pérez-Sánchez, M.; **Sandoval, M.**; Hernaiz, M. J. Bio-solvents change regioselectivity in the synthesis of disaccharides using Biolacta β -galactosidase. Tetrahedron. 2012, 68, 2141-2145.

Pérez-Sánchez, M.; **Sandoval, M.**; Cortés-Cabrera, A.; García-Marín, H.; Sinisterra, J. V.; García, J. I.; Hernaiz, M. J. Solvents derived from glycerol modify classical regioselectivity in the enzymatic synthesis of disaccharides with Biolacta β -galactosidase. Green Chem. 2011, 13, 2810-2817.

Sandoval, M.; Navarrete, S.; Bayón, C.; Langerwisch, U.; Berenguer, J.; Mateo, C.; Guisán, J.M.; Hernaiz, M.; Immobilization of β -galactosidase from *Thermus thermophilus* onto agarose supports for *N*-acetylactosamine synthesis in presence of ionic liquids. Biomacromolecules. 2012. (Enviado)

Sandoval, M.; Ruiz, L.; Civera, C.; Bayón, C.; Hernaiz, M.J.; Improved synthesis of disaccharides with *Thermus thermophilus* β -galactosidase in the presence of bio-solvents. 2012. (En preparación)

Congresos:

Sandoval, M.; Ruiz, L.; Bavaro, T.; Terreni, M.; Hernaiz, M.J. Screening of lipases and green solvents for efficient regioselective asymmetric deacylation of peracetylated sugars. 26 International Carbohydrate Symposium. Madrid, España, 22-27 Julio 2012. Aceptado como póster.

Aires, A.; **Sandoval, M.**; Rumero, A.; Hernaiz, M. J. A green and efficient approach for the synthesis of *N*-acetylactosamine using immobilized Biolacta β -galactosidase on macroporous polymers. 26 International Carbohydrate Symposium. Madrid, España, 22-27 Julio 2012. Aceptado como póster.

Ruiz, L.; Navarrete, S.; **Sandoval M.**; Bayón, C.; Aires, A.; Rumero, A.; Hernaiz M.J. Influence of green solvents on enzymatic activity of free and immobilized TTP0042 recombinant β -galactosidase from *Thermus Thermophilus*. 26 International Carbohydrate Symposium. Madrid, España, 22-27 Julio 2012. Aceptado como póster.

Navarrete, S.; Ruiz, L.; Bayón, C.; **Sandoval M.**; Hernáiz M.J. High-yield enzymatic synthesis of Gal β -(1 \rightarrow 3)GalNAc and Gal β -(1 \rightarrow 3)GlcNAc using recombinant β -galactosidase from *Bacillus circulans*. 26 International Carbohydrate Symposium. Madrid, España, 22-27 Julio 2012. Enviado como póster.

Sandoval, M., Bayón, C., Navarrete, S., Cortés-Cabrera, A., Lozano, P., Berenguer, J., Sinisterra, J.V. and Hernaiz, M.J. Influence of Ionic Liquids on Enzymatic Synthesis of β -Galactosidases: a Surface Plasmon Resonance and Molecular Modeling Analysis. Póster. Biotrans 2011, 10 th International Symposium on Biocatalysis. Sicilia, Italia. 2-6 octubre, 2011. Póster

Sandoval, M. Cortés, A., Ferreras, E., Treviño, J., Berenguer, J., Lozano, P., Sinisterra, J.V. Hernaiz, M.J. Influence of ionic liquids on enzymatic glycosides synthesis with *Thermus thermophilus* β -galactosidase: a surface plasmon resonance and molecular modeling analysis. 16 th European Carbohydrate Symposium. Oral communication. Sorrento, Italia Julio, 2011

Sandoval, M., Aires, A., Navarrete, S., Mateo, C., Rumero, A., Berenguer, P., Guisán, J.M. and Hernaiz, M.J. Characterization and reactivity of immobilized β -galactosidase from *Thermus thermophilus* HB27 (TTP0042) in ionic liquids. Póster. 2nd Internacional Symposium and Advanced Course "Active Pharmaceutical Ingredients from Biotechnology: from Research to Industrial and Regulatory Issues". Madrid, España. 14-17 junio 2011. Póster

Bayón, C., Aires, A., **Sandoval, M.**, Zambelli, P., Rumero, A., Sinisterra, J.V., Hernaiz, M.J. Influence of green solvents on enzymatic activity of free and immobilized β -galactosidases from *Bacillus circulans*. Póster 2nd Internacional Symposium and Advanced Course "Active Pharmaceutical Ingredients from Biotechnology: from Research to Industrial and Regulatory Issues". Madrid, España. 14-17 junio 2011. Póster

Sandoval, M., Pérez, M., Ferreras, E., Hernaiz, M.J., Berenguer, J. and Sinisterra, J.V. Synthesis of glycoconjugates using β -glycosidases from *Thermus thermophilus* HB27. Póster. 5th International Meeting on Biotechnology. Pamplona, España. 29 sep.-1 oct. 2010. Póster

Sandoval, M., Pérez, M., Cortés A., Hernaiz, M. J. A different disaccharides synthesis using glycerol based solvents media with Biolacta β -galactosidases. Poster. X Jornadas de Carbohidratos. Granada, 15-18 septiembre, 2010. Póster

Pérez, M., Ferreras, E.R., **Sandoval, M.**, Sinisterra, J.V., Berenguer, J. and Hernáiz, M.J. Production and characterization of new glycosidases from *Thermus thermophilus*. Póster. Biotrans 2009. 9th International Symposium on Biocatalysis & Biotransformations. Berna, Suiza, Junio 2009. Póster

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo de investigación ha sido desarrollado bajo la dirección de la Doctora María José Hernaiz Gómez-Dégano (Directora del grupo de Investigación en Biotransformaciones) a quien quiero agradecer de la forma más sincera por su tiempo, paciencia, comprensión y apoyo durante la realización del mismo. Así mismo quiero expresar mi agradecimiento al Doctor Andrés Alcántara León, también director del mismo grupo y Doctor Joseph Vicent Sinisterra Gago (antiguo director), por haberme permitido formar parte del grupo de investigación y por su valiosa disponibilidad durante la realización de la investigación. Dentro de este grupo quiero agradecer su disponibilidad, colaboración y su cariño, a la Dra. María Fernández Fernández.

Al profesor Jorge Trelles de la Universidad de Quilmes, Argentina, a la profesora Concepción Civera y al profesor Francisco García Blanco del Departamento de Fisicoquímica de la Facultad de Farmacia y al profesor Miguel Arroyo de la Facultad de Ciencias Biológicas de la UCM quiero agradecer su apoyo logístico en procedimientos experimentales. Agradezco también al Doctor José Berenguer de la Universidad Autónoma de Madrid por su amabilidad al recibirme en su laboratorio para desarrollar procedimientos propios de biología molecular. A los Doctores: José Manuel Guisán, César Mateo y José Palomo, por recibirme en su laboratorio, su ayuda y colaboración. Y al profesor Ángel Rumero por su gran disponibilidad.

Quiero agradecer a mi esposa Yohana Alfaro, a mi padre: Manuel Sandoval, mi madre María del Carmen Barrantes, a mis hermanos Pablo, Diego, Annia, Haylin y Treicy, por que todos ustedes son un regalo de Dios en mi vida. A mis compañeros de trabajo más cercanos: Carlos Bayón, Sara Gómez y Eloy Ferreras, a todos ustedes muchas gracias por su apoyo. Quiero agradecer sus múltiples colaboraciones y sobretodo su amistad, en este último año, a Sergio Navarrete y a Laura Ruiz. Quiero agradecer su compañía y colaboración a lo largo de esta tesis: Antonio Aires, David Muñoz, Javier Tomé, Ulrike Langerwisch, Juan Treviño, Mario Deir, Pilar Hoyos, David Muelas, Alicia Días, Laura Yebes, Vittorio Pace, y María Pérez.

También quiero agradecer a aquellas personas que de una u otra forma han estado a mi lado en España: Alfredo García, Bernardo Torres, Patxi, Pilar, Enrique, Diana, Fernando, Aleyda, Jesús, Freyser, Daniela, José Luis, Carmen Celia, Pedro y Geanina. En Costa Rica: a José Palma y su esposa Marta, a su hijo José y su esposa Maritza, a Randall y Yendry. Gracias por haber estado siempre allí.

Quiero agradecer a los profesores Rocio Madrigal y Marco Calvo de Costa Rica y al profesor Juan Antonio Rodríguez Renuncio de la UCM, por su valioso apoyo y consejería, sobretodo para los trámites de admisión al doctorado y la obtención de la beca para el mismo. Por último y no por ello menos importante, quiero agradecer a la Universidad Nacional de Costa Rica, a su Escuela de Química y su Junta de Becas por haberme otorgado la beca de doctorado que me ha permitido viajar y residir en España.

“NUEVAS ESTRATEGIAS SOSTENIBLES PARA LA SÍNTESIS ENZIMÁTICA DE OLIGOSACÁRIDOS Y GLICOCONJUGADOS DE INTERÉS BIOLÓGICO”

Resumen de la Memoria presentada para optar al grado de Doctor, que presenta:

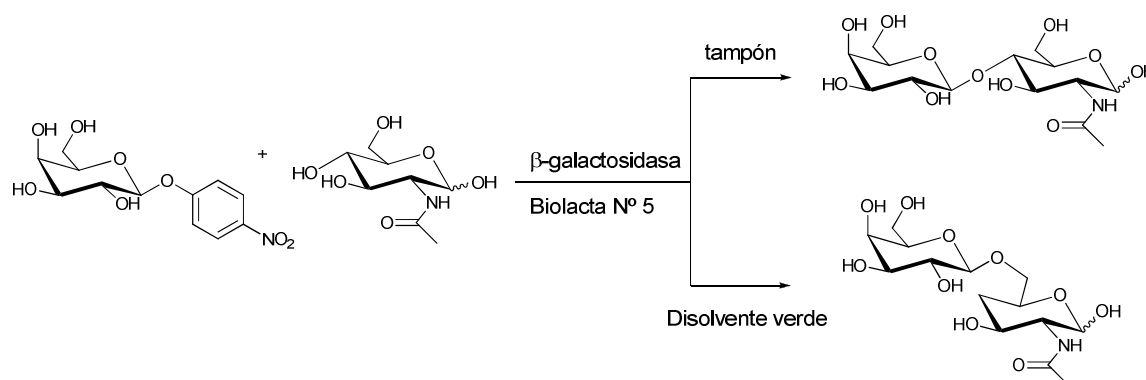
MANUEL SANDOVAL BARRANTES

El principal objetivo del presente trabajo de investigación ha sido evaluar distintas aproximaciones para la obtención por vía enzimática de oligosacáridos y glicoconjugados utilizando diversos tipos de enzimas en condiciones que puedan ser consideradas como sostenibles. Para ello se han considerado varios enfoques que permitan la obtención de tales compuestos y en su caso, la comprensión de los factores que están implicados en la optimización de las reacciones realizadas.

Se han considerado como sostenibles las reacciones realizadas en pocos pasos, con sustratos y productos poco tóxicos, catalizadas por sustancias biodegradables como las enzimas y efectuadas en disolventes considerados verdes, tales como: 1) el agua, 2) disolventes orgánicos de fuentes renovables 3) disolventes orgánicos de bajo impacto ambiental 4) disolventes fluorados y 5) líquidos iónicos (LIs), entre otros.

Se utilizaron glicosidasas procedentes de dos orígenes diferentes: las β -galactosidasas comerciales de Biolacta N°5 (Daiwa Kasei, Japón) conocidas por su utilidad en la síntesis de enlaces $\beta(1\rightarrow4)$ y las β -glicosidasas de *Thermus thermophilus* HB27 conocidas por su actividad en la síntesis de glucósidos, galactósidos y fucósidos con enlaces $\beta(1\rightarrow3)$. Las enzimas provenientes de *T. thermophilus* se clonaron y expresaron en el laboratorio del Prof. José Berenguer por el doctorando Eloy Ferreras (CSIC-UAM). Se han utilizado extractos celulares de *T. thermophilus* inducidos con celobiosa y las enzimas recombinantes TTP0042 (clonada en *Escherichia coli* y en HB27Nar) y TTP0222 (clonada en *E. coli*). Las enzimas recombinantes utilizadas poseen un extremo polipeptídico en el grupo amino terminal que facilita su purificación por cromatografía de afinidad en columnas de níquel (II).

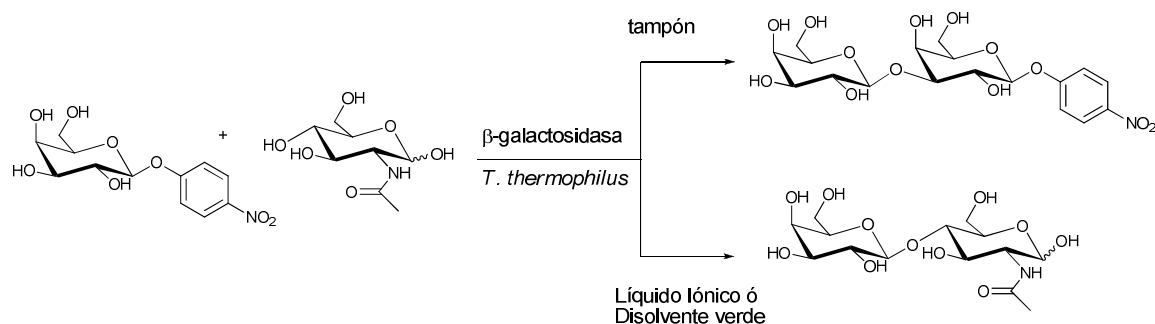
Al realizar un análisis proteómico de la β -galactosidasa de Biolacta N° 5 por medio de su huella peptídica, se encontró que posee una similitud estructural de un 98% con la β -galactosidasa de *Streptococcus pneumoniae* SP9-BS68 cuya masa molecular es de aproximadamente 247 kDa, este dato se determinó con una significancia estadística de $p \leq 0,05$, permitiendo establecer similitudes con otras enzimas y simular por medio de bioinformática el centro activo de la enzima. Se encontró además que esta galactosidasa (aún en ausencia de los estabilizantes no proteicos que normalmente posee) es capaz de cambiar su tendencia desde la síntesis tradicional de enlaces $\beta(1 \rightarrow 4)$ hacia enlaces $\beta(1 \rightarrow 6)$ en presencia de disolventes verdes derivados de dimetilamida o glicerol (Esquema R1). Esta tendencia fue explicada por medio de dinámica molecular y docking, hallando que la interacción entre el grupo acetilo del GlcNAc y el disolvente parecen ser los principales factores que desencadenan un cambio en el modo de unión en de moléculas en el centro activo mejorando la accesibilidad de grupos O4 en agua y O6 en presencia de algunos disolventes verdes.



Esquema R1. Síntesis de disacáridos con la β -galactosidasa de Biolacta N°5: en presencia de tampón realiza principalmente la síntesis del disacárido Gal $\beta(1 \rightarrow 4)$ GlcNAc, mientras que en presencia de ciertos disolventes verdes cambia su preferencia hacia la síntesis de Gal $\beta(1 \rightarrow 6)$ GlcNAc.

Se estudiaron las condiciones óptimas de síntesis con los extractos celulares de *T. thermophilus* HB27 inducidos con celobiososa, determinando que los enlaces de β -fucosa son más favorecidos que los de β -galactosa como sustrato de hidrólisis, el tampón óptimo es fosfato de sodio 25 mM con un pH de 5,50 y no requiere de salinidad adicional. La enzima TTP0042 de este organismo fue clonada y purificada, hallándose como óptimos: un pH de 6,00 en tampón fosfato de sodio 50 mM. Ambos biocatalizadores mostraron ser útiles en la síntesis de Gal- $\beta(1 \rightarrow 4)$ GlcNAc aunque con altos

niveles de otro producto de reacción: Gal- β (1 \rightarrow 3)-Gal- β -pNF. Este producto puede ser inhibido en presencia de LIs y disolventes verdes favoreciendo la síntesis del disacárido. (Esquema R2)



Esquema R2. Síntesis de disacáridos con la β -galactosidasa de *T. thermophilus* HB27: en presencia de tampón realiza principalmente la síntesis del producto de autocondensación del donador: Gal- β (1 \rightarrow 3)-Gal- β -pNF, mientras que en presencia de ciertos disolventes verdes o líquidos iónicos cambia su preferencia hacia la síntesis de Gal β (1 \rightarrow 4)GlcNAc.

La interacción con LIs y la principal β -galactosidasa de *T. thermophilus* (TTP0042) fue estudiada por resonancia de plasmón de superficie y se halló que existe una débil interacción inespecífica entre ambos, con una afinidad en el rango milimolar, lo que podría causar un cambio conformacional en la estructura de la enzima. Dicho cambio conformacional fue confirmado en la estructura secundaria de la proteína por medio de estudios de diroísmo circular y en la estructura terciaria por medio de estudios de emisión de fluorescencia. Finalmente este cambio conformacional fue explicado como un aumento de la flexibilidad de la enzima en presencia de los LIs mediante modelado molecular y docking.

La enzima TTP0042 fue inmovilizada en soportes macroporosos funcionalizados con epóxidos, los cuales fueron sintetizados por el doctorando Antonio Aires en el laboratorio del Profesor Ángel Rumero (UAM) y Eupergit C disponible comercialmente. Los resultados de la inmovilización fueron cercanos al 100% sin embargo no se pudo retener más del 5% de la actividad de la enzima. Se determinó que parte de esta baja retención de actividad está relacionada con un anclaje covalente entre el epóxido del soporte y el tiol de la cisteína 167 de la enzima. Este problema se abordó mediante mutagénesis dirigida cambiando la cisteína por valina ó serina, con bajos resultados. Se intentó luego realizar la inmovilización en presencia de lactosa o galactosa para bloquear el centro activo de la enzima, pero los rendimientos máximos estuvieron sobre un 20% de retención de actividad. Por ello se inmovilizó la enzima sobre glioxil agarosas facilitadas por el grupo del Prof. José Manuel Guisán (CSIC-

UAM) con mejores resultados de retención de la actividad. Esto permitió obtener un aumento de la estabilidad térmica a 70°C, 80°C y 90°C y hasta 13 reusos en reacciones de transglicosilación con una actividad superior al 80%. Se exploró también la opción de inmovilizar la enzima TPP0042 en forma de agregados entrecruzados (CLEAs). Los resultados permitieron obtener altos rendimientos de inmovilización y retención de la actividad.

Se utilizaron lipasas de varios orígenes, la mayoría disponible de forma comercial, tales como: lipasa de *Candida antarctica* (CAL), lipasa B de *C. antártica* (CAL-B), lipasa de *Pseudomonas stutzeri* y lipasa de *Rhizopus oryzae* (ROL). La lipasa ROL, pese a estar disponible comercialmente, fue facilitada por el grupo del Prof. Dr. Paco Valero, de la Universidad Autónoma de Barcelona, quienes la han expresado de forma recombinante en *Pichia pastoris*. Con las lipasas se exploró la opción de acilar la *N*-acetilglucosamina y el *p*-nitrofenil- β -D-galactopiranosido utilizando butirato de vinilo, laurato de vinilo y esterato de vinilo. Sin embargo, pese a explorar numerosos disolventes y variar las condiciones de reacción, no fue posible llegar a obtener resultados aceptables de síntesis de glicoconjugados. Las lipasas de CAL, CAL-B y ROL se inmovilizaron en distintos soportes macroporosos, obteniéndose mejores resultados tanto de inmovilización como de retención de la actividad enzimática con respecto a la enzima TPP0042, principalmente con CAL-B. Sin embargo en la síntesis de ésteres de azúcares con ácidos grasos se continuó obteniendo resultados de hidrólisis pero sin acilaciones.

ABREVIATURAS

ATCC: Colección americana de cultivos tipo (en inglés: *American type culture collection*)

ADN: ácido desoxiribonucleico

BSA: Albúmina de suero bovino (*bovine serum albumin*)

BL21: cepa de *E. coli* BL21

CAL: Lipasa de *Candida antarctica* (*C. antarctica lipase*)

CAL-B: Lipasa B de *Candida antarctica* (*C. antarctica lipase B*)

CBMSO: Centro de Biología Molecular Severo Ochoa

CCF: cromatografía de capa fina

CPME: ciclopentenil metil éter

CRL: Lipasa de *Candida rugosa* (*C. rugosa lipase*)

CSIC: Consejo Superior de Investigaciones Científicas

DH5 α : cepa de *E. coli* DH5 α

DC: dicroísmo circular

DT: tubo de deriva (*Drift tube*)

EDTA: ácido etilendiamino tetraacético

ELSD: detector de dispersión de luz por evaporación (*evaporative light scattering detector*)

Fuc: D-(+)-fucosa

Gal: D-(+)-Galactosa

GalNAc: *N*-acetil-D-galactosamina

GalNH₂.HCl: clorhidrato de D-galactosamina

G1: 1,3-dioxan-5-ol

GC7: 1-isopropoxi-3-(2,2,2-trifluoroetoxi)propan-2-ol

GC8: 1,3-bis(2,2,2-trifluoroetanol)propan-2-ol

GC11: 1,3-dibutoxipropan-2-ol

Glc: D-(+)-Glucosa

GlcNAc: *N*-acetil-D-glucosamina

GlcNH₂.HCl: clorhidrato de D-glucosamina

Glu: ácido glutámico

HB27: *Thermus thermophilus* HB27

HB27Nar: *Thermus thermophilus* HB27 conjugante

His₆tag: extremo polipeptídico con 6 histidinas añadido al grupo amino terminal de una proteína

HPLC: cromatografía líquida de alta resolución (*High performance liquid chromatography*)

IPTG: isopropil- β -D-tiogalactopiranosido

ITC: microcalorimetría por titulación isotérmica (*isothermal titration calorimetry*)

K_M: constante de Michaelis-Menten.

LacNAc: *N*-acetil-D-lactosamina (Gal β [1 \rightarrow 4]GlcNAc)

LB: medio de cultivo Luria Bertani

LB_{kan30}: medio de cultivo Luria Bertani con kanamicina 30 μ g/mL

LI: líquido iónico

LNB: Lacto-*N*-biosia I (Gal β [1 \rightarrow 3]GlcNAc)

Man: D-(+)-Manosa

MES: ácido 2-(*N*-morfolino) etanosulfónico

MeTHF: metil tetrahidrofurano

***N*-Allo:** *N*-acetil-D-alolactosamina (Gal β [1 \rightarrow 6]GlcNAc) también *N*-Alo LacNAc

NCBI: base de datos: *Nacional Center for Biotechnology Information*

***o*NF- β -Gal:** *o*-nitrofenil- β -D-galactopiranosido

PCM: Parque Científico de Madrid

PET 28b(+): plásmido comercial PET 28b(+) (Novagen, Reino Unido)

***p*NF:** *p*-nitrofenol

***p*NF- β -Fuc:** *p*-nitrofenil- β -D-fucóspiranosido

***p*NF- β -Gal:** *p*-nitrofenil- β -D-galactopiranosido

***p*NF- β -Glc:** *p*-nitrofenil- β -D-glucopiranosido

***p*NF- β -Gli:** *p*-nitrofenil- β -D-glicósido

PSA: persulfato de amonio

psi: libras por pulgada cuadrada (unidades de presión: *pounds per square inch*)

PMKE2: plásmido no comercial para expresión de proteínas recombinantes en HB27

ROL: Lipasa de *Rhizopus oryzae* (*R. oryzae* lipase)

RMSD: raíz media de desviación de los cuadrados (*root mean square deviation*)

SC: cámara de spray (*Spray Chamber*)

SDS: dodecil sulfato de sodio (*sodium dodecyl sulphate*)

SDS-PAGE: gel de electroforesis de poliacrilamida en presencia de SDS (desnaturalizante)

SOC: medio de cultivo rico en nutrientes para cultivar bacterias sometidas a electroporación

SPR: Resonancia de plasmón de superficie

TAE: tampón tris (40 mM) /EDTA disódico (2mM) / ácido acético 0,1142% m/v)

Temed: tetrametiletilendiamina

TRIS: tris(hidroximetil)aminometano

TTP0042: enzima TTP0042 de *Thermus thermophilus* HB27

TTP0042 his₆tag: enzima TTP0042 de *Thermus thermophilus* HB27 con cola de histidina

TTP0222: enzima TTP0222 de *Thermus thermophilus* HB27

TTP0222 his₆tag: enzima TTP0222 de *Thermus thermophilus* HB27 con cola de histidina

TH: medio de cultivo para *Thermus thermophilus* (preparado con agua milli Q)

TH_{ff}: medio de cultivo para *Thermus thermophilus* (preparado con agua fontjaraba)

T42kat: mutante de HB27 que produce la enzima TTP0042 de forma atrofiada.

U: unidad (es) enzimática (s)

UAM: Universidad Autónoma de Madrid

UV: ultravioleta (detector de)

V_{max}: velocidad máxima de una enzima según una cinética de Michaelis-Menten

VOC: compuesto orgánico volátil (por sus siglas en inglés: volatile organic compound)

INDICE

1. INTRODUCCIÓN	3
1.1. IMPORTANCIA BIOLÓGICA DE LOS OLIGOSACÁRIDOS Y GLICOCONJUGADOS	3
1.2. QUÍMICA VERDE: CONCEPTOS FUNDAMENTALES	5
1.2.1. Los 12 principios de la química verde	5
1.2.2. Disolventes verdes	6
1.3. SÍNTESIS ENZIMÁTICA DE OLIGOSACÁRIDOS Y GLICOCONJUGADOS: PERSPECTIVA DESDE LA QUÍMICA VERDE	13
1.3.1. Síntesis de oligosacáridos utilizando glicosidasas	15
1.3.2. Síntesis de oligosacáridos utilizando galactosidasas	18
1.3.3. Síntesis de oligosacáridos utilizando lipasas	25
1.3.4. Síntesis enzimática de carbohidratos utilizando enzimas en presencia de disolventes verdes	31
1.4. HERRAMIENTAS PARA EL ESTUDIO RACIONAL DEL EFECTO DE DISOLVENTES VERDES	35
1.4.1. Resonancia de plasmón de superficie	36
1.4.2. Microcalorimetría por titulación isotérmica	38
1.4.3. Dicroísmo circular	39
1.4.4. Fluorescencia	41
1.4.5. Herramientas de Bioinformática	41
1.5. INMOVILIZACIÓN DE ENZIMAS	45
	46
1.5.1. Tipos de inmovilización de enzimas	
1.5.2. Síntesis de oligosacáridos y glicoconjugados utilizando enzimas inmovilizadas	53
2. OBJETIVOS	59
3. MATERIALES Y MÉTODOS	63
3.1. MATERIALES Y EQUIPO INSTRUMENTAL	63
	63
3.1.1. Reactivos y disolventes	
3.1.2. Plásmidos, cepas y enzimas	65
3.1.3. Medios de cultivo	66
3.1.4. Instrumentación general y métodos analíticos.	67
3.2. PROCEDIMIENTOS GENERALES	71
	71

3.2.1. Transformación de bacterias	
3.2.2. Técnicas de electroforesis	73
3.2.3. Cuantificación de Proteínas	74
3.2.4. Determinación de actividad enzimática	76
3.2.5. Purificación de enzimas recombinantes con colas de histidina	81
3.2.6. Seguimiento de transglicosilación por HPLC	82
3.3. SÍNTESIS DE OLIGOSACÁRIDOS CON β-GALACTOSIDASAS DE BIOLACTA	84
3.3.1. Caracterización y purificaciones de la enzima comercial	84
3.3.2. Síntesis de disacáridos con las enzimas de Biolacta en medio acuoso	86
3.3.3. Reacciones de transglicosidación en presencia de disolventes verdes.	87
3.3.4. Reacciones de transglicosidación en presencia de líquidos iónicos.	88
3.3.5. Análisis proteómico de enzimas de Biolacta	88
3.3.6. Estudios de modelado molecular y docking	89
3.4. SÍNTESIS DE OLIGOSACÁRIDOS CON β-GALACTOSIDASAS DE <i>Thermus thermophilus</i> HB27	92
3.4.1. Producción y optimización de biocatalizadores termófilos	92
3.4.2. Síntesis de disacáridos utilizando biocatalizadores termófilos en medios acuosos	100
3.4.3. Síntesis de disacáridos con biocatalizadores termófilos en presencia de líquidos iónicos	103
3.4.4. Reacciones de transglicosidación con TTP0042 his ₆ tag en disolventes verdes	105
3.4.5. Estudios de interacciones moleculares	105
3.4.6. Síntesis de disacáridos con la enzima TTP0042 inmovilizada	113
3.5. SÍNTESIS DE GLICOCONJUGADOS CON LIPASAS	125
3.5.1. Caracterización de lipasas	125
3.5.2. Síntesis de glicoconjugados utilizando lipasas libres	127
3.5.3. Síntesis de glicoconjugados utilizando lipasas inmovilizadas	131
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	135
4.1. SÍNTESIS DE OLIGOSACÁRIDOS CON β-GALACTOSIDASAS DE BIOLACTA	135
4.1.1. Caracterización y purificaciones de la enzima comercial	135
4.1.2. Síntesis de disacáridos con la β -galactosidas Biolacta en medios acuosos tamponados	141
4.1.3. Síntesis de disacáridos con la β -galactosidas Biolacta en presencia de disolventes verdes	145
4.1.4. Análisis proteómico de las proteínas presentes en Biolacta N° 5	156
4.1.5. Estudios de modelado molecular y docking con enzimas de Biolacta	160

4.2. SÍNTESIS DE OLIGOSACÁRIDOS CON β-GALACTOSIDASAS DE <i>Thermus thermophilus</i> HB27	165
4.2.1. Producción y caracterización de los distintos biocatalizadores termófilos	165
4.2.2. Síntesis de disacáridos utilizando biocatalizadores de origen termófilo	182
4.2.3. Reacciones de transglicosidación con biocatalizadores termófilos en presencia de líquidos iónicos.	190
4.2.4. Síntesis de disacáridos con la enzima TTP0042 His ₆ tag (<i>E. coli</i>) en disolventes verdes.	197
4.2.5. Estudio de interacciones moleculares con la enzima TTP0042	201
4.3. SÍNTESIS DE DISACÁRIDOS CON LA ENZIMA TTP0042 INMOVILIZADA	215
4.3.1. Inmovilización de TTP0042 sobre polímeros macroporosos	215
4.3.2. Inmovilización de TTP0042 sobre glioxil agarosas	226
4.3.3. Inmovilización de TTP0042 en CLEA's	237
4.3.4. Síntesis de Gal β (1 \rightarrow 4)GlcNAc con TTP0042 inmovilizada sobre diferentes soportes	238
4.3. SÍNTESIS DE GLICOCONJUGADOS CON LIPASAS	239
4.4.1. Caracterización de las lipasas utilizadas	239
4.4.2. Síntesis de glicoconjugados utilizando lipasas libres	242
4.4.3. Síntesis de glicoconjugados utilizando lipasas inmovilizadas	246
5. CONCLUSIONES	253
6. REFERENCIAS	261
7. ANEXOS	279

I. INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

1.1. IMPORTANCIA BIOLÓGICA DE LOS OLIGOSACÁRIDOS Y GLICOCONJUGADOS

Los hidratos de carbono son compuestos de gran importancia biológica con reconocidas funciones para el desarrollo neuronal, proliferación y muerte celular, metástasis y embriogénesis.¹⁻⁷

La mayor parte de las interacciones de estos carbohidratos en los fenómenos anteriormente mencionados, se deben a procesos específicos de reconocimiento molecular entre las hormonas, toxinas, virus, bacterias o células y los glicoconjugados presentes en las membranas celulares (Figura 1).¹⁻⁸ Los glicoconjugados de las membranas celulares son por lo general cadenas relativamente cortas de distintos azúcares (generalmente oligosacáridos) que están unidos a lípidos (glicolípidos) y proteínas (glicoproteínas y/o proteoglicanos). La interacción ocurre mediante fuerzas de adhesión y/o repulsión entre el hidrato de carbono de la superficie celular y las distintas sustancias del entorno, lo que permite generar respuestas por parte de la célula.¹⁶⁻¹⁹

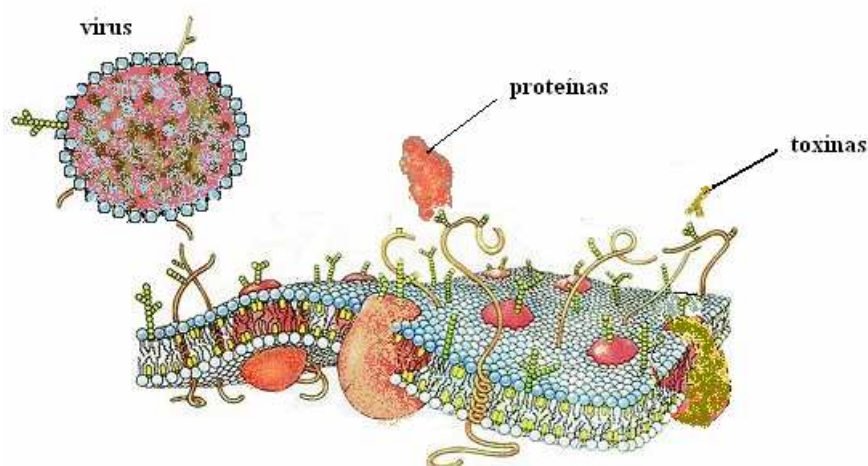


Figura 1. Esquema de algunas interacciones moleculares que ocurren en la membrana celular donde participan glicoconjugados presentes en ésta. (Imagen modificada de la original, accesada en la página <http://www.ncnr.nist.gov/programs/reflect/cnbt/>).

Uno de los ejemplos de gran trascendencia en procesos de reconocimiento celular, es el antígeno Thomsen-Friedereich, conocido como antígeno T ($D\text{-Gal-}\beta[1\rightarrow3]\text{-GalNAc-Ser/Thr}$, figura 2), este fue descubierto en 1930 como una curiosidad de laboratorio,¹ sin

embargo varias décadas después, ésta molécula y su precursor, el antígeno Tn (GalNAc-Ser/Thr, Figura 2), han sido firmemente asociadas en tumores,^{2,3} llegando a ser expresiones inmunoreactivas del 85% de los carcinomas de seno, colon, vejiga y próstata, sin embargo no aparecen en tejidos sanos.^{1,4}

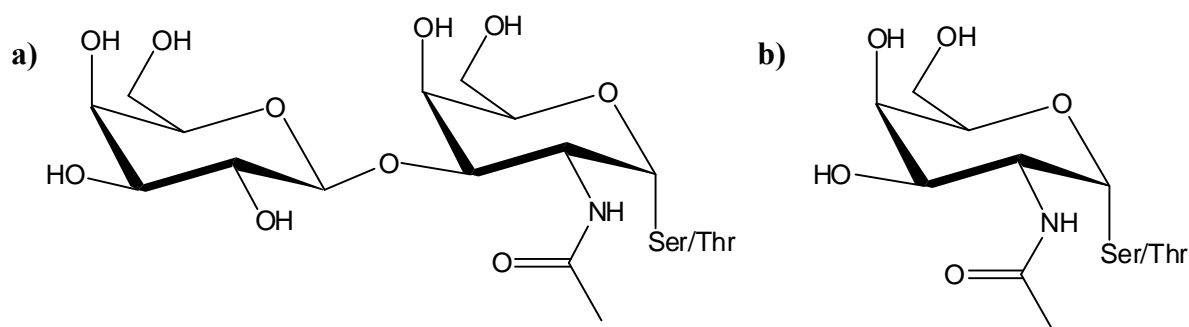


Figura 2. a) Estructura del antígeno T b) estructura del antígeno Tn

Otro disacárido de gran importancia biológica es la *N*-acetil-D-lactosamina (LacNAc, D-Gal- β [1 \rightarrow 4]-GlcNAc, Figura 3) el cual es considerado como una estructura representativa de los oligosacáridos presentes en glicoproteínas y glicolípidos,¹³⁻¹⁵ y participa en procesos relacionados con la inmunohematología (por ejemplo la formación de polímeros conocidos como poli-LacNAc) y como carbohidrato de los antígenos asociados a los tumores.⁴⁻⁸

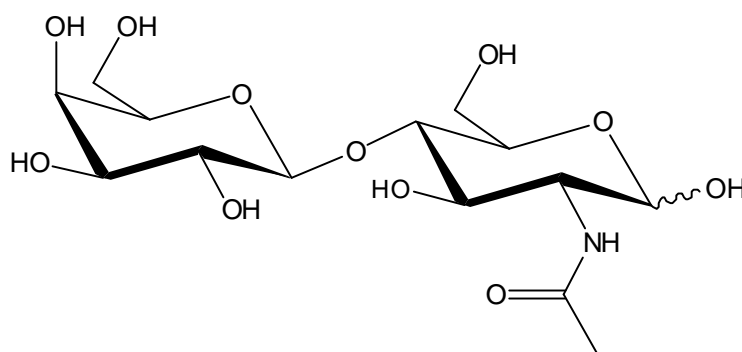


Figura 3. Estructura de la *N*-acetil-D-lactosamina (LacNAc, D-Gal- β [1 \rightarrow 4]-GlcNAc)

Lo anterior justifica la creciente investigación para obtener estos epítomos específicos en cantidades suficientes para llevar a cabo estudios que determinen su verdadera implicación, así como miméticos que puedan ser utilizados en estas patologías. Este hecho requiere de la exploración de diversas metodologías de síntesis que permitan preparar éstos epítomos y análogos de estos.

1.2. QUÍMICA VERDE: CONCEPTOS FUNDAMENTALES

A inicio de la década de 1990, apareció un campo de estudio emergente denominado “Química Verde” el cual pretende la implementación de procesos amigables con el ambiente en la industria química.⁹⁻¹² Otro de los nombres dados a la química verde es el de “tecnologías sostenibles”.⁴

El nombre “Química Verde” fue acuñado inicialmente en la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos de América por Paul Anastas⁵, y para el año de 1993 esta entidad crea el Programa de Química Verde en dicho país⁴. En palabras de Anastas y Warner se obtiene la siguiente definición para este campo:

*“La química verde es el diseño de productos y procesos químicos que reducen o eliminan la generación de residuos y sustancias tóxicas”*⁶.

Otra definición sobre este campo la ofrece Sheldon:

“La química verde utiliza eficientemente materias primas (preferiblemente de fuentes renovables), elimina residuos, y evita el uso de reactivos y disolventes tóxicos y/o peligrosos para la salud, en la manufactura y elaboración de productos químicos”.^{4,7}

1.2.1. Los 12 principios de la química verde

La química verde está basada en 12 principios que en general pretenden un diseño ambientalmente benigno de productos y procesos.^{4,5} Estos principios son:⁶

1. Prevención: es mejor prevenir la formación de residuos que dar tratamiento o limpiarlos una vez creados.
2. Economía atómica: los métodos de síntesis deberían estar diseñados para maximizar la incorporación en el producto final, de todos los materiales usados en el proceso de producción.
3. Síntesis químicas menos peligrosas (y/o tóxicas): dentro de lo posible, los métodos de síntesis deberían ser diseñados para usar y generar sustancias que posean poca o ninguna toxicidad para la salud humana o el ambiente.

4. Diseño de productos químicos seguros: los productos químicos deberían ser diseñados para obtener la función deseada minimizando su toxicidad.
5. Disolventes y auxiliares más seguros: el uso de sustancias auxiliares, como disolventes, reactivos de separación, entre otros, debería ser un hecho innecesario y dentro de lo posible dichas sustancias deben ser inocuas al ser usadas.
6. Diseño con eficiencia energética: los requerimientos energéticos de procesos químicos deberían ser reconocidos por su impacto ambiental y económico y deberían ser minimizados. De ser posible los métodos de síntesis deberían ser realizados a temperatura y presión ambiente.
7. Uso de materias primas renovables: deberían emplearse éstos materiales siempre que sea técnica y económicamente viable.
8. Reducción de derivados: los derivados utilizados (en procesos de bloqueo, protección, desprotección, etc.) deben ser minimizados e incluso anularse de ser posible ya que cada paso requiere reactivos adicionales y esto genera residuos.
9. Catálisis: los reactivos catalíticos (tan selectivos como sea posible) se emplearán en lugar de reactivos estequiométricos.
10. Diseño para la degradación: los productos químicos deben ser diseñados para que al final de su función se transformen en productos de degradación inocuos y no persistan en el ambiente.
11. Análisis en tiempo real para prevenir la contaminación: será necesario desarrollar metodologías analíticas para permitir en tiempo real el seguimiento y control durante el proceso antes de que se produzcan sustancias peligrosas.
12. Química inherente a la seguridad para evitar accidentes: deben seleccionar las sustancias y su forma para minimizar el potencial de accidentes, incluidas emanaciones, explosiones e incendios.⁶

1.2.2. Disolventes Verdes

El concepto de disolventes verdes es bastante restringido si se consideran los postulados de la química verde ya mencionados. Esto implica analizar muchos supuestos y por ello la clasificación de los disolventes considerados verdes, no estará exenta de tensiones en su totalidad, ya que difícilmente un mismo disolvente cumple todos los requerimientos presentados. Desde esta perspectiva se ha llegado a postular que el disolvente más verde en sí mismo no es un disolvente,⁸ sin embargo existen notorias ventajas de utilizar disolventes

para el desarrollo de reacciones químicas respecto a los medios sin disolventes, algunas de las ventajas citadas por Hernaiz y colaboradores,⁹ son las siguientes:

- Las reacciones ocurren rápidamente y con mayor facilidad cuando los reactivos están disueltos, por que se reducen las restricciones de transferencia de masa.
- Los disolventes pueden afectar los rendimientos y las regioselectividades de una reacción debido a la distinta solvatación de reactivos, intermediarios y estados de transición.
- Los disolventes actúan como medios para transferir el calor ayudando a minimizar los cambios bruscos de temperatura por gradientes más moderados
- Muchas veces los disolventes facilitan la separación y purificación de los productos.

Desde una perspectiva legal, en la Unión Europea, los disolventes deben reunir una serie de características que hagan su uso menos peligroso y más seguro para el ambiente, por este motivo se ha limitado el uso de compuestos orgánicos volátiles (VOC's por sus siglas en inglés), ya que muchos de esos vapores son tóxicos para el ser humano, constituyendo una amenaza a la salud de quienes lo utilizan y a la vez pueden potenciar efectos dañinos en el ambiente como daños a la capa de ozono y potenciar el efecto de invernadero.⁹

Tomando en cuenta los aspectos legales sobre la sostenibilidad de los disolventes y los doce principios de la química verde, en especial los principios 3, 4 y 5,^{6, 10} se han considerado como disolventes verdes los siguientes: 1) el agua, 2) disolventes orgánicos de fuentes renovables, 3) disolventes orgánicos de bajo impacto ambiental, 4) los disolventes fluorados 5), los líquidos iónicos (LIs), 6) fluidos supercríticos (FSC)^{17, 19, 20}. Para el presente trabajo se han utilizado disolventes descritos en las anteriores categorías con excepción de los fluidos supercríticos.

1.2.2.1. El agua

Por sus características, el agua se puede considerar el disolvente verde por excelencia,¹¹ pues no es tóxico para el ser humano ni para el ambiente, no es inflamable, disuelve las enzimas en su forma natural, no requiere procesos de manufactura (aunque si de purificación), etc. Desde una perspectiva de la química sostenible, el agua es un excelente disolvente. Sin embargo desde la perspectiva de síntesis química, muchas veces el agua no

es un buen disolvente de reactivos, o resulta no ser un buen disolvente para los productos, lo que obliga a buscar métodos de separación de mezclas para purificar el producto deseado.⁹

1.2.2.2 Disolventes orgánicos de fuentes renovables

Los disolventes orgánicos tradicionales son en su mayoría derivados del petróleo (una materia prima no renovable) e incumplen algunos de los postulados de la química verde,⁶ entre los que se pueden mencionar los siguientes: aumentan la formación de residuos, los procesos de síntesis química en éstos son relativamente peligrosos (lo que requiere cuidados adicionales en el proceso de síntesis), muchos de ellos son volátiles por lo que se aumentan las emisiones de VOC's además de que por lo general poseen cierta toxicidad para el ser humano y el medio ambiente.

La obtención de disolventes procedentes de la biomasa puede disminuir muchas de las características mencionadas anteriormente. En primer lugar constituyen en si mismos una forma de evitar residuos, pues convierten lo que sería un potencial residuo en un nuevo disolvente, adicionalmente el diseño de éstos disolventes puede ser mejorado para cumplir otras características como mejorar su compatibilidad con la salud y el medio ambiente. Dos de los disolventes de fuentes renovables más conocidos y utilizados son el etanol y metanol,¹² pues se puede producir en grandes cantidades por fermentación en procesos relativamente sostenibles y en si mismo es una sustancia que puede ser biodegradada con facilidad.

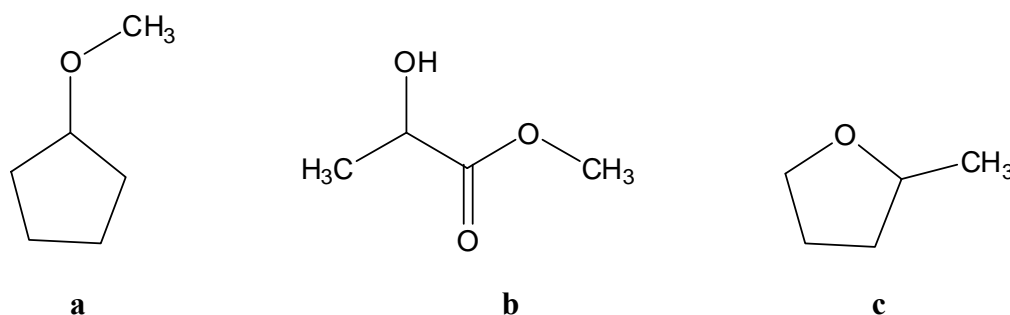


Figura 4. Estructura de algunos disolventes de fuentes renovables disponibles comercialmente¹³. a) CPME b) lactato de metilo c) MeTHF.

Por otro lado también existen otros disolventes de fuentes renovables que también están ya comercializados por LOBA Chemie y Sigma-Aldrich, y entr ellos podemos citar el

ciclopentenil metil éter (CPME), lactato de etilo y el metiltetrahidrofurano (MeTHF) (Figura 4).¹³ Otros disolventes derivados de fuentes renovables están en fase de exploración, uno de los ejemplos más claros es el proyecto europeo SolveSafe,¹⁴ constituido por una plataforma innovadora de pequeñas y medianas empresas junto con sectores de investigación, este proyecto tenía como metas la reducción de disolventes tóxicos/peligrosos actualmente utilizados, reducir los compuestos orgánicos volátiles enviados a la atmósfera, reducir las emisiones de dióxido de carbono a la atmósfera y aumentar la cantidad de materiales renovables en uso.¹⁴

Finalmente, es importante comentar que el actual aumento en la producción de biodiesel (en parte debido al innegable hecho de que los combustibles fósiles son fuentes en proceso de agotamiento) ha conllevado a un aumento en su principal sub-producto de manufactura: el glicerol, el cual constituye cerca de un 10% de la masa total en el proceso de producción.¹⁵ ¹⁶ Por lo anterior, es posible prever un aumento masivo en la producción de glicerol como subproducto de la industria del biodiesel, lo cual lo convierte en una posible materia prima a utilizar derivada de la biomasa. Por este motivo se ha explorado la posibilidad de sintetizar y caracterizar disolventes derivados del glicerol, como una alternativa de aprovechamiento de éste subproducto de la industria del biodiesel.^{17, 18}

1.2.2.3. Disolventes orgánicos de bajo impacto ambiental

En un estudio publicado en el año 2007, Capello y col.¹² realizaron un análisis sistemático de 26 disolventes tradicionales de uso común en la química orgánica, ellos realizaron el análisis utilizando dos enfoques, el primero de ellos denominado EHS (del inglés: “*enviromental, health and safety*”, ambiente, salud y seguridad) que se basa en los riesgos potenciales de las sustancias químicas (irritación, toxicidad, inflamabilidad, etc.) y el segundo se conoce como LCA (del inglés: “*life cycle assesement*”, evaluación del ciclo de vida), que contempla factores como las emisiones al ambiente durante la vida útil del mismo: producción, uso, reciclabilidad potencial (destilación) y disposición final (en algunos casos incineración, como medida más benigna para el ambiente).

Bajo estas perspectivas, los disolventes orgánicos más sostenibles son: el etanol, el metanol y el acetato de metilo. Otros disolventes relativamente sostenibles, bajo este estudio, considerando que pueden ser destilados y reutilizados (o en su caso incinerados) son:

acetato de etilo, acetato de butilo, etil benceno, 1-propanol, 1-butanol, xileno, etilmetilcetona, tolueno, isopropanol y la acetona (figura 5).

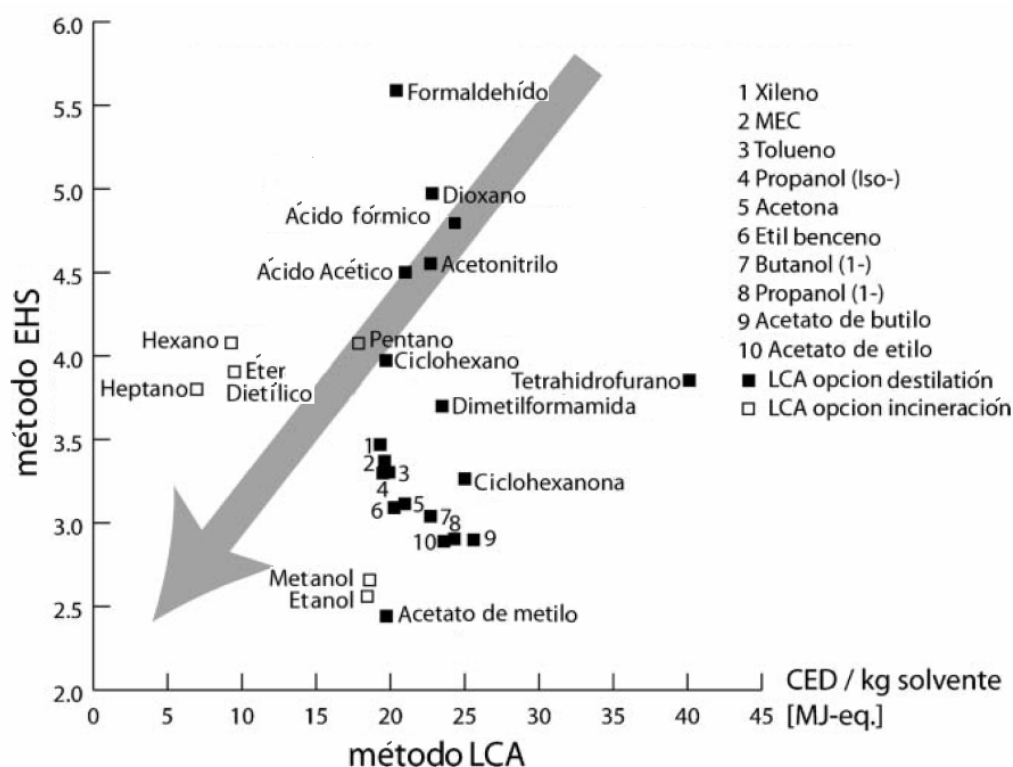


Figura 5. Evaluación de la sostenibilidad de disolventes orgánicos tradicionales basados en la escala LCA y EHS. La flecha gris indica la tendencia hacia disolventes más verdes. (Imagen tomada y traducida de la referencia original, Capello y col.¹²).

1.2.2.4. Disolventes orgánicos fluorados

La extracción por disolvente es una técnica muy utilizada en química orgánica, siendo los disolventes más utilizados el éter etílico, diclorometano, cloroformo y agua. Este proceso se realiza normalmente mediante la explotación de la inmiscibilidad de dos fases líquidas, por lo general una acuosa y otra orgánica. En este sentido los compuestos fluorados se conocen como la "tercera fase líquida", ya que los disolventes orgánicos, el agua y los compuestos fluorados son mutuamente inmiscibles (figura 6).¹⁹ Esta propiedad es a menudo una función dependiente de la temperatura y permite obtener a mayores temperaturas un sistema monofásico que luego desaparece a bajas temperaturas, facilitando obtener el producto deseado en una de las fases.¹⁹⁻²⁴

Dada su variable solubilidad, los disolventes fluorados pueden ser empleados en reacciones químicas a temperaturas en las que solo existe una fase y posteriormente, se pueden enfriar hasta separar los reactivos y productos en la fase correspondiente. Esta característica aumenta la eficiencia de los sistemas de reacción y permite además recuperar el disolvente disminuyendo su impacto en el ambiente.



Figura 6. Fotografía de una extracción con tres fases: orgánica, inorgánica y fluorada. (Imagen modificada de DeSimone 2002).²⁰

Algunos disolventes fluorados (DF) son derivados perfluorados de alcanos, dietileter y trietilaminas, éstos se caracterizan por que sus interacciones moleculares son muy débiles, teniendo menor punto de ebullición y menor polaridad que sus correspondientes alcanos.^{21, 34, 35} El disolvente perfluorado más barato disponible comercialmente es el conocido como “FC-72” ó perfluorohexano (C_6F_{14}). Sin embargo muchas reacciones se han descrito en el perfluorometil ciclohexano (PFMC), que es en si mismo una alternativa más costosa. Sin embargo, el uso en general de DF se encuentra limitado por el alto coste que suponen.^{19, 22, 35, 36}

Respecto a la síntesis enzimática de glicoconjugados, los DF se han utilizado en forma de fluidos supercríticos (fluoroformo) con la β -galactosidasa de *B. circulans*, para la síntesis del 1-*O*-(5-fenilpentil)- β -D-galactopiranosido²¹ y con lipasas para catalizar reacciones de transesterificación (tetrafluoroetano y fluoroformo).²²

1.2.2.5. Líquidos iónicos (LI)

Los líquidos iónicos (LIs) son una nueva clase de disolventes no moleculares que han sido recientemente desarrollados y su uso se ha extendido ampliamente a varios campos de estudio, entre ellos, reacciones bajo catálisis enzimática⁵⁰⁻⁵². Los LIs están compuestos completamente de iones, generalmente consisten de cationes orgánicos y aniones que pueden ser, tanto orgánicos como inorgánicos. Actualmente son sustancias que despiertan gran interés en cuanto a su uso, debido a sus muchas propiedades: son líquidos a temperatura ambiente,²³ térmicamente estables,²⁴ polares,²⁵ relativamente inertes,²⁶ tienen una presión de vapor casi nula,²⁷ no son inflamables,²⁸ presentan una buena conductividad iónica,²⁹ bajos puntos de fusión³⁰ y amplias ventanas electroquímicas.³¹

Los bajos puntos de fusión de los LIs (generalmente inferior a 100°C),³² se han explicado por el gran tamaño que poseen sus iones y la pequeña carga de los mismos, por lo que la energía necesaria para romper los enlaces entre éstos es más baja que la energía requerida para una sal clásica como el cloruro de sodio.³³ Respecto a su polaridad, los estudios espectroscópicos sugieren que es similar a los alcoholes de bajo peso molecular como el metanol y el etanol.³⁴

Muchas de las propiedades de los LI tales como viscosidad, presión de vapor, polaridad, y solubilidad, entre otras, se pueden modificar con una correcta selección de los aniones y cationes, llegando incluso a diseñar LI solubles en disolventes como hexano o incluso insolubles en agua.^{34, 35} Algunos de éstos disolventes pueden disolver cantidades relativamente grandes de azúcares, hasta 200 gramos por litro utilizando sacarosa, glucosa, lactosa y ciclodextrina,³⁶ razón por la cual pueden ser una fuente de interés en la síntesis de enzimática de oligosacáridos.

Inicialmente estas sustancias se consideraron como disolventes verdes, dado que son frecuentemente utilizados en procesos catalíticos,³⁷ se pueden reciclar,³⁸ aumentan en muchos casos los rendimientos y pueden ser utilizados en lugar de disolventes orgánicos volátiles (incluso a temperaturas altas para reacciones enzimáticas y con mejores rendimientos), evitando con esto la emisión de vapores a la atmósfera³⁷ y de riesgos a la salud humana (por inhalación). Por éste motivo, existen varias publicaciones que promocionan los LIs como disolventes verdes y de notorios resultados en catálisis

enzimática.³⁹⁻⁴¹ Algunos autores sostienen que la biodegradabilidad de los LIs puede ser en algunos casos puede ser difícil de alcanzar y que la ecotoxicidad de los mismos puede superar la de disolventes orgánicos tradicionales,⁴² sin embargo la estructura de cada LI puede ser utilizada para estimar teóricamente las probabilidades de su ecotoxicidad, lo cual es una herramienta que permite evitar el escalado de reacciones y procesos que luego pueden ser perjudiciales ambientalmente.⁴³

1.3. SÍNTESIS DE ENZIMÁTICA DE OLIGOSACÁRIDOS Y GLICOCONJUGADOS: PERSPECTIVA DESDE LA QUÍMICA VERDE

Los oligosacáridos (también conocidos como “glicanos”) son la mayor clase de carbohidratos presentes en la naturaleza llegando a tener hasta 10 unidades de monosacárido unidas covalentemente entre sí. Por otra parte los glicoconjugados son moléculas en las que los oligosacáridos están unidos a lípidos o proteínas para dar lugar a glicolípidos o glicoproteínas, respectivamente.⁴⁴

El creciente auge en la química de hidratos de carbono ha buscado la optimización de metodologías para la obtención de oligosacáridos que pueden reproducir los glicoconjugados presentes en los fenómenos de reconocimiento molecular, así como oligosacáridos ligados a otros fenómenos bioquímicos. Por ello se han utilizado las formas más variadas de obtención de azúcares utilizando: síntesis química,⁶¹⁻⁶⁶ enzimática,⁶⁷⁻⁷³ o bien una mezcla de ambas (quimioenzimática).⁵⁷⁻⁶²

La síntesis química de oligosacáridos se caracteriza por varios pasos de protección y desprotección, siendo primordial la correcta activación y protección de la posición anomérica.⁴⁵⁻⁴⁷ Algunas de las metodologías clásicas para la activación y modificación de carbohidratos fueron las descritas por Koenigs y Knorr,⁴⁵ Schmidt y col.,^{46, 47} y Tietze y col.⁴⁸. Un aspecto importante a considerar en la síntesis química de oligosacáridos es la regio y estereoselectividad que se requiere para obtener las moléculas de interés específico para cada finalidad por lo que se requieren numerosos pasos de protección y desprotección lo que obliga a buscar métodos con la menor cantidad de reacciones intermedias para mejorar los rendimientos y disminuir los residuos,¹⁰¹⁻¹⁰³ ya que muchas veces los múltiples pasos en la síntesis de carbohidratos derivan en procesos poco sostenibles y con gran impacto para el medio ambiente.

Otras de las desventajas que presenta la aproximación química es la gran cantidad de residuos que se genera así como el uso de sustancias contaminantes como parte del medio de reacción, en muchos casos utilizando precursores ó disolventes halogenados,⁹⁷⁻⁹⁹ agentes oxidantes fuertes¹⁰⁴ ó sales de metales pesados como mercurio (II) ó plata (I)^{97, 104, 105}. Este hecho, supone claramente una incompatibilidad entre el obtener derivados de carbohidratos por síntesis química y las metodologías verdes, pues se contravienen los principios de: prevención, economía atómica, síntesis menos contaminantes (y/o tóxicas), disolventes y auxiliares más seguros y reducción de derivados, todos ellos principios de la química sostenible citados anteriormente.⁶

Por otra parte la biocatálisis es una perspectiva muy atractiva para la síntesis de compuestos en condiciones ambientalmente benignas, ya que ofrecen condiciones de reacción moderadas, catalizadores biodegradables y ambientalmente aceptables (normalmente agua), además suelen transcurrir con una alta regio, quimio y estereoselectividad. A estas ventajas se les suma el hecho de que realizan rutas sintéticas más cortas debido a que no requieren pasos de protección y desprotección por lo que generan menos deshechos.^{49, 50} Todos estos factores, permiten apreciar la síntesis enzimática de oligosacáridos como procesos mucho más sostenibles que los procesos químicos tradicionales. La síntesis enzimática implica prevención de residuos al evitar pasos de protección y desprotección, además de ser relativamente más regioselectiva que la síntesis química, constituye en si misma un proceso de catálisis. Se utilizan sustancias menos tóxicas, se disminuye el uso de auxiliares y muchas veces el disolvente es agua, dependiendo del tipo de enzima utilizada las condiciones de síntesis se realizan a temperatura y presión ambiente. Todo lo anterior está en clara armonía con varios de los principios de la química sostenible ya discutidos.⁶

Para llevar a cabo la síntesis enzimática de oligosacáridos y glicoconjugados se pueden utilizar principalmente tres varios tipos de enzimas: 1) glicosiltransferasas (E.C. 2.4.); 2) glicosidasas (E.C. 3.2.1.); 3) glicosintasas (E.C. 3.2.1. glicosidasas),⁵¹ estas son un grupo de enzimas se ha incluido recientemente y que derivan de las glicosidasas. Por otro lado también se pueden utilizar otras enzimas para llevar a cabo modificaciones en el anillo del azúcar, como pueden ser las lipasas. Las lipasas (E.C. 3.1.1.) son unas enzimas cuya función natural es la hidrólisis de triacil gliceróles, su uso en la síntesis de azúcares consiste en la reacción inversa a la hidrólisis utilizando moléculas distintas al agua, como por ejemplo azúcares, lo que permite, bajo las condiciones adecuadas, la acilación de los azúcares con

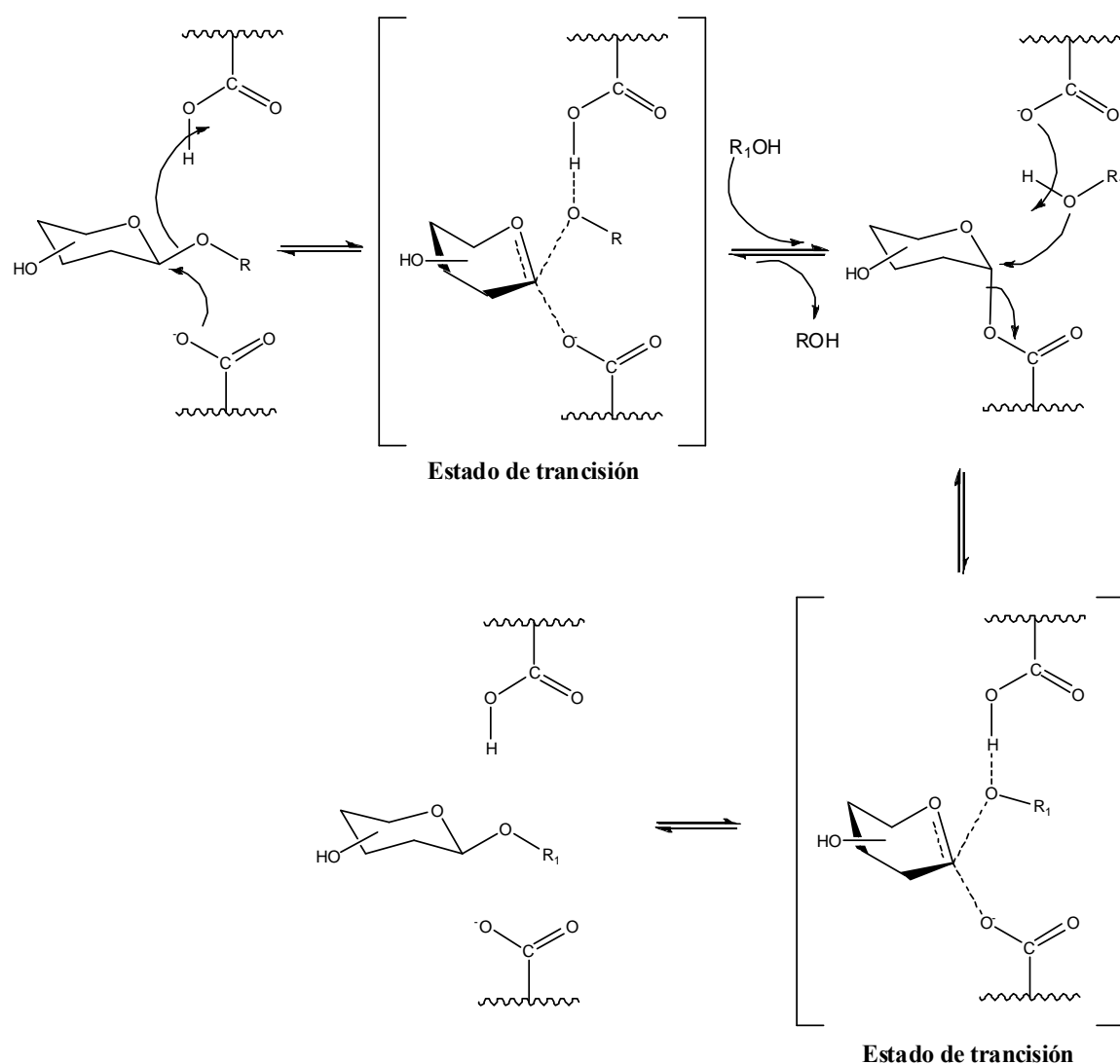
ácidos grasos que provienen de ésteres, muchas veces activados como ésteres vinílicos. También existe la opción de acetilar completamente un azúcar y utilizar la hidrólisis regioselectiva de la lipasa para eliminar alguno de los grupos acetilo, dando lugar a productos desprotegidos en zonas muy específicas. Para el presente trabajo se utilizarán glicosidasas y lipasas como biocatalizadores para obtener disacáridos y glicoconjugados.

1.3.1. Síntesis de oligosacáridos utilizando glicosidasas

Las glicosidasas constituyen una gran familia de enzimas (E.C. 3.2.x.y.) que están involucradas en la hidrólisis de enlaces glicosídicos, se encuentran ampliamente distribuidas en la naturaleza y han sido aisladas de distintas fuentes naturales, tanto eucariotas como procariotas.⁹⁰⁻⁹² La mayoría son exo-glicosidasas, es decir, que hidrolizan únicamente residuos glicosídicos terminales aunque también existen las endo-glicosidasas, que hidrolizan residuos glicosídicos de una cadena oligosacáridica.⁷⁶⁻⁷⁸ Las glicosidasas, no necesitan la intervención de ningún cofactor y muestran una elevada especificidad por el residuo glicosídico y la naturaleza del enlace glicosídico.¹¹⁵⁻¹¹⁸ En 1995, Withers y Aebersold⁵² propusieron el sistema de trabajo en el centro activo de las glicosidasas que se mantiene vigente hasta hoy (Esquema 1).

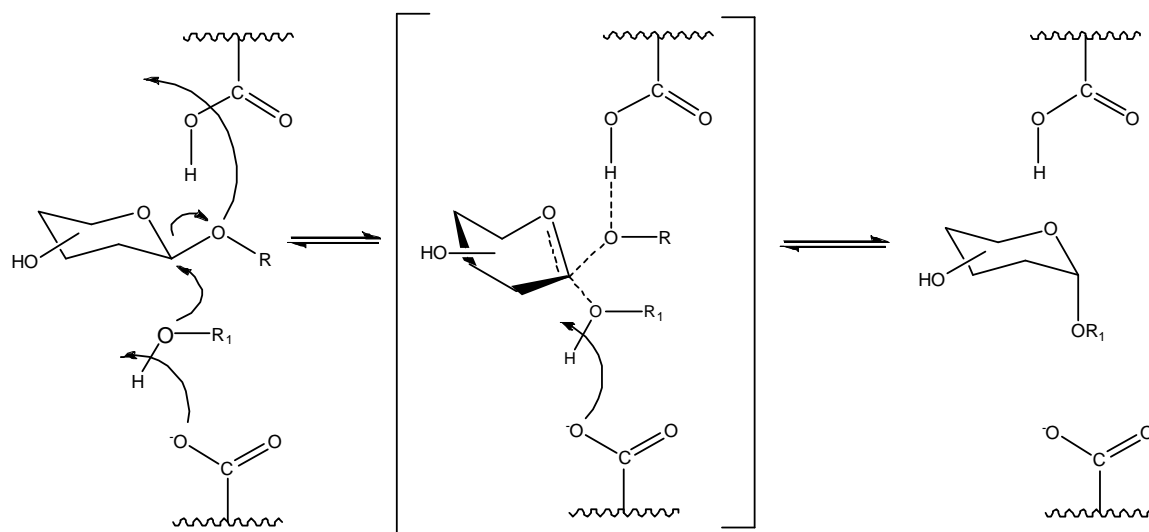
La función biológica de las glicosidasas es catalizar la hidrólisis de determinados carbohidratos. En el mecanismo de reacción de las glicosidasas (Esquema 1) intervienen dos residuos de ácido glutámico que para efectos prácticos se suelen denominar: Glu¹ y Glu².⁵³ En un primer paso el Glu¹ protona el oxígeno del carbono anomérico, lo que lo convierte en un buen grupo saliente a uno de los azúcares, mientras que el Glu² con carga negativa realiza un ataque sobre el carbono anomérico que posee una carga parcialmente positiva, generando un intermediario enzima-azúcar (ver esquema 1).⁵²

En el segundo paso, el complejo azúcar-enzima es atacado por un nucleófilo (R₁OH) que puede ser agua, en este caso la reacción favorecida es la hidrólisis, si el nucleófilo es un azúcar la reacción favorecida es la síntesis de un oligosacárido, a esta última reacción se le denomina “transglicosilación”.⁹⁸⁻¹⁰¹ El tamaño y forma del azúcar pueda realizar este ataque glicosídico dependerá de la naturaleza de la enzima y en especial de su centro activo, así también el tipo de enlace generado: α , β y su dirección: [1→3], [1→4], [1→6], etc.



Esquema 1. Mecanismo de reacción en los sitios activos de las glicosidasas con retención de la configuración, propuesto por Whitters y Aebersold.⁵² Mecanismo con intermedio, que implica la unión covalente glicosil-enzima que luego se rompe.⁵⁴

Algunas glicosidasas realizan mecanismos que permiten invertir la configuración sobre el carbono anomérico (esquema 2).⁵² Estas enzimas actúan en un solo paso, mediante el cual el nucleófilo desplaza directamente al grupo saliente ROH. Lo cual se asemeja a un mecanismo de tipo S_N2 .



Esquema 2. Mecanismo de reacción en el centro activo de las glicosidasas que invierten la configuración propuesto por Whitters y Aebersold.⁵²

El mecanismo por el cual las glicosidasas realizan la síntesis de disacáridos requiere condiciones distintas a las condiciones de trabajo en matrices biológicas donde la enzima realiza exclusivamente la hidrólisis. Partiendo del mecanismo anteriormente explicado, se pueden entender con facilidad las estrategias desarrolladas en la síntesis de oligosacáridos con éstas enzimas. La estrategia consiste en sustituir al agua como nucleófilo para que disminuir la hidrólisis y favorecer la entrada de otras moléculas (azúcares) para sintetizar oligosacáridos. Esta estrategia se logran por aproximaciones termodinámicas y cinéticas, tal y como se muestra a continuación:

1- La aproximación termodinámica: se basa en desplazar un equilibrio químico, favoreciendo la reacción inversa, por ello se le suele conocer como “hidrólisis inversa” o “síntesis por equilibrio controlado”⁵¹, esto implica optimizar condiciones de temperatura, pH, salinidad y principalmente colocar en exceso productos de hidrólisis (v.g. galactosa, que actuarían luego como nucleófilo), y disminuir la presencia de agua, para evitar favorecer la hidrólisis.^{13, 63-66} Por ello se suelen utilizar mezclas de agua-disolvente, evitando que ésta alcance concentraciones importantes y con ello disminuyendo las posibilidades de que pueda entrar al centro activo de la enzima y con ello disminuya la hidrólisis.

2- La aproximación cinética: Consiste en usar glicósidos activados que se unen con un nucleófilo dentro del centro activo de la enzima y aumentar la concentración del aceptor. En estos caso se suelen utilizar donadores que poseen buenos grupos salientes, por ejemplo glicósidos con fluoruros, azida o (*p/o*)-nitrofenil, entre otros. Una vez formado el producto de reacción puede ser hidrolizado por la enzima, pero este hecho dependerá de que la transglicosidación sea más rápida que la hidrólisis y que la hidrólisis del producto de reacción sea más lenta que la del donador.^{33, 125, 129}

1.3.2. Síntesis de oligosacáridos utilizando β -galactosidasas

Dentro de las glicosidasas, hay gran variedad de enzimas, las cuales pueden clasificarse en función del tipo de sustrato que reconocen y según el tipo de enlace que hidrolizan. Uno de los grupos de interés para el presente trabajo de investigación han sido las β -galactosidasas (EC 3.2.1.23) estas enzimas están presentes en plantas, animales y microorganismos, han sido estudiadas por la industria alimenticia debido a su capacidad de hidrolizar la lactosa, por lo que también se les denomina “lactasas” pero también se han utilizado para sintetizar oligosacáridos (en especial galactooligosacáridos), glicoconjugados (glicopéptidos, glicolípidos y *O*-alquilglicósidos) que contienen enlaces β en la posición 1 de la galactosa.⁶⁷⁻

71

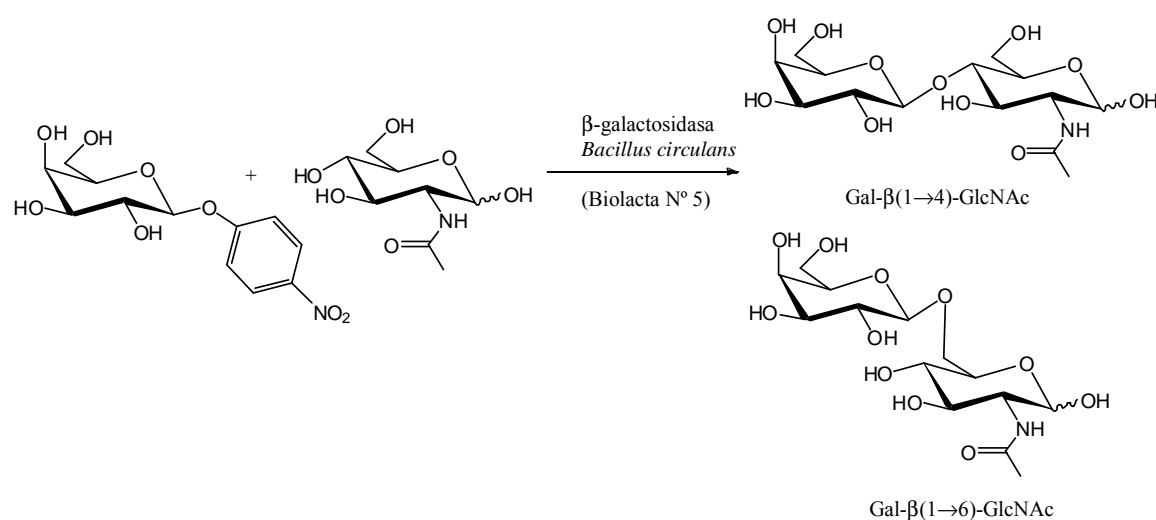
Para el presente trabajo de investigación se han seleccionado dos tipos específicos de β -galactosidasas para ser utilizadas como catalizador, éstas son: 1)- β -galactosidasa de *Bacillus circulans* (enzima comercial y fracciones semipurificadas) y 2)- β -glicosidasa de *Thermus thermophilus* HB27 (extractos celulares y su enzima TTP0042). Ambas se caracterizan por que dentro de su actividad, presentan una alta afinidad por sustratos que contienen galactosa.

1.3.2.1. β -Galactosidasa de *Bacillus circulans*: Biolacta No 5 (Daiwa kasei)

Bacillus circulans es una bacteria Gram positiva en forma de bastón que se ha encontrado en los suelos. La enzima comercial biolacta No 5 de la casa Daiwa kasei (Osaka, Japón), es una β -galactosidasa que según especificaciones de su fabricante proviene del organismo *Bacillus*

circulans y según la literatura consultada, éste preparado comercial se elabora con la cepa ATTC 31382 de dicha especie.⁵⁵

Del preparado comercial se han realizado estudios que determinaron su actividad sintética durante la hidrólisis de lactosa, identificando hasta 11 oligosacáridos como subproductos de la reacción,⁵⁶ por otra parte se han ensayado reacciones de transglucosilación donde principalmente se emplea el *p*-nitrofenil- β -D-galactopiranosido (*p*NF- β -Gal) como donador y la *N*-Acetil-D-glucosamina (GlcNAc) como aceptor, por lo que se conoce que ésta enzima favorece enlaces de tipo $\beta(1\rightarrow4)$ dando lugar a la síntesis de *N*-Acetil-D-Lactosamina (Gal- $\beta(1\rightarrow4)$ GlcNAc ó LacNAc) y en menor cantidad $\beta(1\rightarrow6)$ obteniéndose *N*-Acetil-D-Alolactosamina (Gal- $\beta(1\rightarrow6)$ GlcNAc ó N-Allo, ver Esquema 3).⁵⁷ El disacárido $\beta(1\rightarrow4)$ es conocido como una estructura representativa de los núcleos estructurales de los oligosacáridos presentes en glicoproteínas y glicolípidos,^{2, 13-15} y su síntesis química se ha estudiado y se ha abordado para hacerla más eficiente pero se caracteriza por pasos elaborados de protección y desprotección,⁶¹⁻⁶⁴ lo que hace más atractiva la síntesis mediante métodos enzimáticos, a la vez que más sostenible.



Esquema 3. Síntesis de *N*-acetil-D-lactosamina, isómero $\beta(1\rightarrow4)$, catalizada por las β -galactosidasas contenidas en Biolacta N° 5, utilizando *N*-Acetil-D-glucosamina (GlcNAc) como aceptor y *p*-nitrofenil- β -D-galactopiranosido (*p*NF- β -Gal) como donador. Esta reacción suele generar como producto secundario *N*-acetil-D-alolactosamina (isómero $\beta(1\rightarrow6)$).

Curiosamente el preparado comercial de Biolacta No5 no sintetiza oligosacáridos con enlaces $\beta[1\rightarrow3]$, lo cual si se ha descrito para la cepa ATCC31382 de éste organismo.⁵⁸ Estudios con esta cepa han permitido clonar el gen que posee actividad de síntesis $\beta[1\rightarrow3]$ ⁵⁵ y además caracterizar la enzima recombinante.⁵⁹ La razón por la cual el preparado comercial no posee ésta actividad es hasta cierto punto desconocida y se ha descrito que puede ser debido a una represión debida al medio de cultivo utilizado durante la producción o bien, a pérdidas en el proceso de ultrafiltración de Biolacta.⁵⁵

La síntesis de disacáridos $\text{Gal}\beta(1\rightarrow4)\text{GlcNAc}$ y $\text{Gal}\beta(1\rightarrow6)\text{GlcNAc}$ ha sido ampliamente estudiada por varios grupos de investigación^{106, 120, 121} con la finalidad de mejorar los rendimientos del isómero $\beta(1\rightarrow4)$ o de cambiar su regioselectividad para favorecer uno de los isómeros formados. Dentro de las estrategias empleadas para mejorar este proceso, se han considerado como opciones disminuir la temperatura el tiempo de incubación (3h), las unidades enzimáticas (6U) y el pH (5,0).⁶⁰

β -Galactosidasas aisladas de Biolacta No 5

En 1984 Mozzafar y colaboradores⁶¹ lograron aislar dos β -galactosidasas dentro del preparado comercial de Biolacta No 5 utilizando técnicas como la cromatografía de permeabilidad en gel y de intercambio iónico. De éste trabajo se concluyó que las β -galactosidasas aisladas, denominadas como I y II, poseen un peso molecular aparente de 240 kDa y 160 kDa respectivamente. Este valor se obtuvo por filtración en gel (sephadex G-200) y se corroboró con electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS (SDS-PAGE). Estos parámetros determinados en éste estudio se muestran en la tabla 1.

Casi 14 años después, Vetere y Paoletti⁶² realizan un proceso de purificación con el fin de aumentar la regioselectividad de las síntesis de disacáridos utilizando enzimas de *B. circulans* y en dicho proceso se encuentran con una tercera isoenzima de este tipo. En dicha publicación realizan un estudio comparativo de las enzimas aisladas con respecto a las encontradas inicialmente por Mozzafar y colaboradores,⁶¹ aunque finalmente no se hace mención a la síntesis de oligosacáridos con éstas enzimas. Las diferencias más importantes, a juicio de los autores⁶² fueron los pesos moleculares de las enzimas, pues en este nuevo

estudio los pesos moleculares aparentes fueron de 212, 140 y 86 kDa. Varios de los parámetros medidos en este estudio se muestran en la tabla 1.

Tabla 1. Comparación de las propiedades de las β -galactosidasas purificadas del preparado comercial Biolacta No 5 en los estudios publicados.

Enzima	Peso Molec. (kDa) ^a	Peso Molec. (kDa) ^b	Actividad Específica U/mg ^a (40°C, pH 6,0)	Actividad Específica U/mg ^{b, c}	pH óptimo ^a	pH óptimo ^b	Temp. Óptima ^a	Temp. Óptima ^b
I	240	212	128 (2-16mM)	75,2	6,0	6,0	45 °C	44 °C
II	160	145	56 (2-16mM)	15,3	6,0	4,0	60 °C	74 °C
III	--	86	--	10,2	--	4,0	--	60 °C

NOTAS: En todos los casos, los datos están referidos a la hidrólisis de *o*NF- β -Gal. El peso molecular reportado es el peso molecular aparente determinado según metodología del estudio referido. ^aEstudio realizado por Mozzafar y colaboradores⁶¹. ^b Estudio realizado por Vetere y Paoletti⁶². ^c Valores máximos reportados en el estudio en mención, no se indica la concentración de sustrato ni condiciones del ensayo para tales actividades.

Una de las observaciones más importantes de los estudios anteriores, es que no existe constancia en ninguno de ellos, de que las enzimas purificadas ni la enzima comercial hallan sido sometidas a electroforesis en condiciones no desnaturalizantes con la finalidad de ver subunidades y/o conglomerados liberados en el SDS-PAGE. Este es un hecho de suma importancia, ya que en el primer caso, Mozzafar y colaboradores⁶¹ aislaron dos enzimas bajo la consigna de ser monoméricas, mientras que el estudio de Vetere y Paoletti⁶² se aislaron tres enzimas, pero no se realizó afirmación alguna sobre esta temática. Finalmente, a la fecha, no se conoce a fondo cual de las tres enzimas es la responsable de la síntesis de cada uno de los disacáridos (β [1→4] y β [1→6]), pues los autores de los estudios de tales purificaciones no lo explicaron y al parecer, no existen publicaciones sobre éste tema.

1.3.2.2. β -Glicosidasas de *Thermus thermophilus* HB27

En las últimas décadas se han descubierto microorganismos capaces de vivir en condiciones que desde una perspectiva humana parecen imposibles, a los cuales se les conoce como extremófilos, sus condiciones de vida pueden implicar bajas ó altas temperaturas, valores de pH extremos ó altos niveles de sal, siendo el principal requisito para su desarrollo la

disponibilidad de agua líquida.⁶³ Esta resistencia a ambientes extremos hacen de estos organismos y en especial sus enzimas, biocatalizadores de gran interés industrial.⁹⁶⁻¹⁰¹

Los organismos que poseen una temperatura óptima de crecimiento entre 45°C y 80°C se denominan termófilos y los que superan este valor se denominan hipertermófilos.¹³¹⁻¹³⁴ La termoestabilidad de éstos organismos se ha intentado explicar en varios estudios, en parte se ha atribuido a la mayor cantidad de interacciones moleculares como por ejemplo: puentes de hidrógeno, interacciones iónicas, puentes disulfuro e interacciones hidrofóbicas,⁶⁴ a la mayor cantidad de cargas eléctricas en la superficie de la proteína, a un aumento en la hidrofobicidad de su núcleo y al reemplazo de aminoácidos considerados como “termolábiles” que están expuestos al solvente.^{65, 66}

Dentro de los organismos termofilos, el género *Thermus*, establecido por Brock y Freeze en 1969,⁶⁷ es uno de los más extendidos. Incluye cepas termófilas e hipertermófilas que por lo general son aerobias, con una pigmentación amarillo-anaranjada o rojiza.⁶⁸ La especie *Thermus thermophilus* es una bacteria extremadamente termofílica y halotolerante, su cepa HB27 originalmente aislada de ambientes termales en Japón, fue secuenciada genéticamente y en el año de 2004 se publicó su genoma.¹⁶¹ Su cultivo a nivel de laboratorio se caracteriza por altas tasas de crecimiento, permitiendo obtener fácilmente grandes volúmenes de células.⁶⁹ Dentro de su proteoma se ha identificado una β -glicosidasa con actividad selectiva a enlaces β -fucosídicos, β -galactosídicos y β -glucosídicos (TTP0042), y dos β -galactosidasas putativas (TTP0220 y TTP0222),^{161, 163, 164} cuya naturaleza hidrolítica ha sido corroborada en estudios posteriores.^{13, 70}

Estudios con especies del género *Thermus* han mostrado que las cepas silvestres pueden ser inducidas para producir mayor actividad enzimática de tipo β -glicosidasa al cultivarse en medios enriquecidos con celobiosa,⁷¹ este fenómeno ha sido identificado en otros organismos termófilos⁷⁵ y mesófilos¹⁶⁸⁻¹⁷¹. Por el contrario, el uso de glucosa en dichos medios tiende a reprimir la producción de este tipo de enzimas.⁷¹ En el pasado se había descubierto que al cultivar la cepa HB27 en medio empobrecidos en nutrientes (8 y 4 veces empobrecidos respecto al medio THff) y enriquecidos con celobiosa (0,1%-0,2%) se obtenía un aumento de hasta 6,5 veces en la actividad β -galactosidasa y 6,1 veces en la actividad β -fucosidasa en los extractos celulares de ésta cepa respecto al control.^{13, 70} Recientemente, el

grupo del profesor José Berenguer ha estudiado la relación entre la celobiosa y el aumento en las actividades enzimáticas de tipo β -galactosidasa con la especie *T. thermophilus* HB27 y han logrado establecer que la TTP0042 se expresa desde un sistema operón de degradación de celobiosa.⁷⁰

La enzima TTP0042 de *Thermus thermophilus* HB27

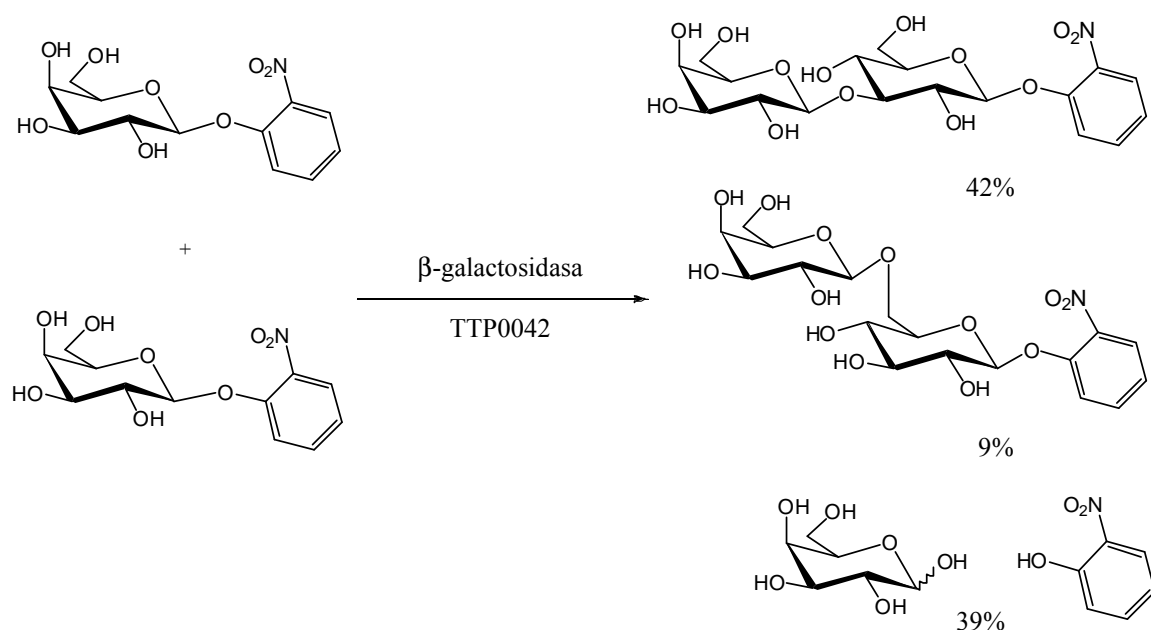
En el año de 1999, Dion y colaboradores,⁷² decodificaron el gen de una β -glucosidasa (que por su ubicación en el genoma se le denomina como TTP0042)⁷³ y la sobreexpresaron en cepas de *Escherichia coli* para purificar la proteína recombinante, dada la ventaja que supone eliminar proteínas mesófilas por calentamiento mientras que las termófilas permanecen casi intactas.⁷² Dicha enzima es una β -glucosidasa termoestable codificada en el plásmido por 1296 pb que expresan 431 aminoácidos con una masa molecular teórica de 48,642 kDa. Posee una importante actividad de tipo β -glucosidasa, β -galactosidasa y β -fucosidasa.⁷² TTP0042 guarda altos niveles de homología con otras enzimas del género *Thermus* (Tabla 2)

Tabla 2. Comparación de algunos parámetros bioquímicos de la actividad β -galactosidasa entre varias β -glucosidasas de organismos termófilos y la enzima TTP0042 de la cepa HB27.

Organismo (enzima)	Sustrato	Homología con TTP0042	Actividad Específica U/mg (<i>o/p</i> NFGal)	pH óptimo	Referencias
<i>Thermus thermophilus</i> HB27(TTP0042 ⁷³)	<i>p</i> NF- β -Gal	N/A	N/D	6,0-7,5	Dion <i>et al.</i> ⁷² Fourage <i>et al.</i> ⁷⁴ Henne <i>et al.</i> ⁷³ Kang <i>et al.</i> ⁷⁵
<i>Thermus sp. IB 21</i> (BglA)	<i>p</i> NF- β -Gal	94%	88,6 (5mM)	5,0-6,0	Kang <i>et al.</i> ⁷⁵
<i>Thermus sp. IB 21</i> (BglB)	<i>p</i> NF- β -Gal	98%	267 (5 mM)	5,0-6,0	Kang <i>et al.</i> ⁷⁵
<i>Thermus Nonproteolyticus</i> HG102	<i>p</i> NF- β -Gal	85%	5358 (N/D)	5,6	Xiangyuan <i>et al.</i> ⁷⁶
<i>Thermus thermophilus</i> HJ6 (<i>Tt</i> - β -Gly)	<i>p</i> NF- β -Gal	95,6%	N/D	6,0-7,5	Gu <i>et al.</i> ⁷⁷
<i>Thermus flavus</i> AT-62	<i>p</i> NF- β -Gal	98%	68,5 (1mM)	5,0-6,0	Kang <i>et al.</i> ⁷⁸
<i>Thermus caldophilus</i> GK24 (β glT)	N/D	92%	83 (5mM)	5,5-6,5	Han <i>et al.</i> ⁷⁹
<i>Thermus sp. A4</i> (BgaA)	<i>o</i> NF- β -Gal	--	N/D	6,5	Ohtsu <i>et al.</i> ⁸⁰ .
<i>Thermus sp. T2</i> (BgaA)	<i>o</i> NF- β -Gal ⁸¹	--	191 (5mM) ⁸¹	5,0-7,5 ⁸²	Koyama <i>et al.</i> ⁸¹ Pessela <i>et al.</i> ⁸²

N/A: No aplica N/D: Dato no disponible.

La purificación de ésta enzima por medio de clonación y expresión en *E. coli* es relativamente sencilla, pues al expresarla en una bacteria mesófila, sus extractos celulares se pueden someter a un calentamiento leve entre 60°C y 80°C por cortos periodos de tiempo (40 minutos) inactivando las glicosidasas de *E. coli* por desnaturalización y coagulando muchas de las proteínas de éste organismo, las cuales se pueden separar luego por centrifugación, como se realiza en muchos de éstos casos^{80, 82, 83} obteniéndose un extracto enzimático semipurificado que luego puede someterse a otros procedimientos de purificación de la enzima^{93, 95-97} o utilizarse directamente como catalizador.^{102, 147}



Esquema 4. Autocondensación de *o*-nitrofenil- β -D-galactopiranosido utilizando la enzima TTP0042 de *Thermus thermophilus* HB27 como catalizador.⁸³ Los resultados obtenidos para los aceptores utilizados por este autor (relación molar 1:3 donador: aceptor), en su mayoría muestran una alta tendencia a la autocondensación del sustrato con enlaces $\beta(1\rightarrow3)$.

Los extractos enzimáticos semipurificados con TTP0042 han sido utilizados para medir la actividad sintética de ésta enzima y se encontró que poseen una alta tendencia a la autocondensación del sustrato donador con enlaces glucosídicos de tipo $\beta[1\rightarrow3]$, (ver esquema 4) obteniéndose un rendimiento máximo de 50% de producto de autocondensación y rendimientos mucho menores de oligosacáridos (v.g. Glc $\beta[1\rightarrow3]\alpha$ Glc-O-Me y Fuc- $\beta[1\rightarrow6]$ -Gal).¹²⁷ En dicho estudio las reacciones se realizaron con cantidades muy distintas de enzima que van desde 7,4 hasta 23 unidades enzimáticas, la relación molar del

donador:aceptor fue de 3:1 y las temperaturas de reacción fueron relativamente bajas (entre 20°C y 55°C) para evitar favorecer la hidrólisis del sustrato donador.

Otros estudios utilizando esta misma enzima para síntesis de disacáridos plantean temperaturas de 60°C, una relación donador:aceptor de 1:10 y una menor cantidad de unidades enzimáticas (0,1U por mililitro de medio de reacción) con rendimientos de hasta un 88% de en reacciones de transfucosilación, pero con rendimientos finales del 25% (producto purificado luego de la cromatografía en columna de carbón celite), en dicha publicación los autores enumeran varias reacciones de transfucosilación pero no especifican la naturaleza de los productos obtenidos, sino que aportan la evidencia de la reactividad mediante espectros de masas.⁸⁴

1.3.3. Síntesis de glicoconjugados utilizando lipasas.

Las lipasas (EC 3.1.1.3, triacilglicerol lipasas) son enzimas que catalizan la hidrólisis y síntesis de ésteres carboxílicos. Están ampliamente distribuidas en la naturaleza y se pueden encontrar en: animales, plantas, hongos y bacterias.^{129, 130} Se caracterizan por su alta regioselectividad y estereoselectividad.¹³¹⁻¹³³ Una de las principales características de las lipasas es su promiscuidad catalítica, definida como la capacidad que poseen las enzimas de catalizar reacciones que se diferencian de su reacción fisiológica natural.¹³⁴⁻¹³⁶ Dada esta característica, se han logrado realizar numerosas reacciones catalizadas por distintas lipasas en las que se obtienen productos con enlaces distintos a ésteres,⁸⁵ tales como: la síntesis de amidas,⁸⁶ reacción de Mannich,^{138, 139} adiciones aldólicas⁸⁷ y formación de enlaces carbono-carbono,^{88, 89} entre otras.

1.3.3.1. Mecanismo catalítico de las lipasas

Las lipasas son enzimas que debido a su mecanismo de catálisis resultan muy versátiles y dan lugar a numerosas reacciones. El mecanismo catalítico de las lipasas (Esquema 5) es muy similar al mecanismo que presentan las enzimas de tipo serin-proteasas.¹²⁸⁻¹³⁰ En el año de 1990 luego de realizarse estudios de difracción por rayos X, se encontraron dos estructuras posibles para las lipasas.⁹⁰ En ellas se determinó una estructura única que no se ha encontrado en ningún otro tipo de enzima.⁹¹ Las lipasas presentan dos posibles formas: “tapadera abierta” y “tapadera cerrada”. La forma de tapa cerrada es una forma inactiva que

impide el acceso de los sustratos al centro activo de la enzima y la forma de tapa cerrada facilita su acceso.⁹⁰ La figura 7 muestra un ejemplo de esta estructura para la lipasa de *Mucor miehei*.

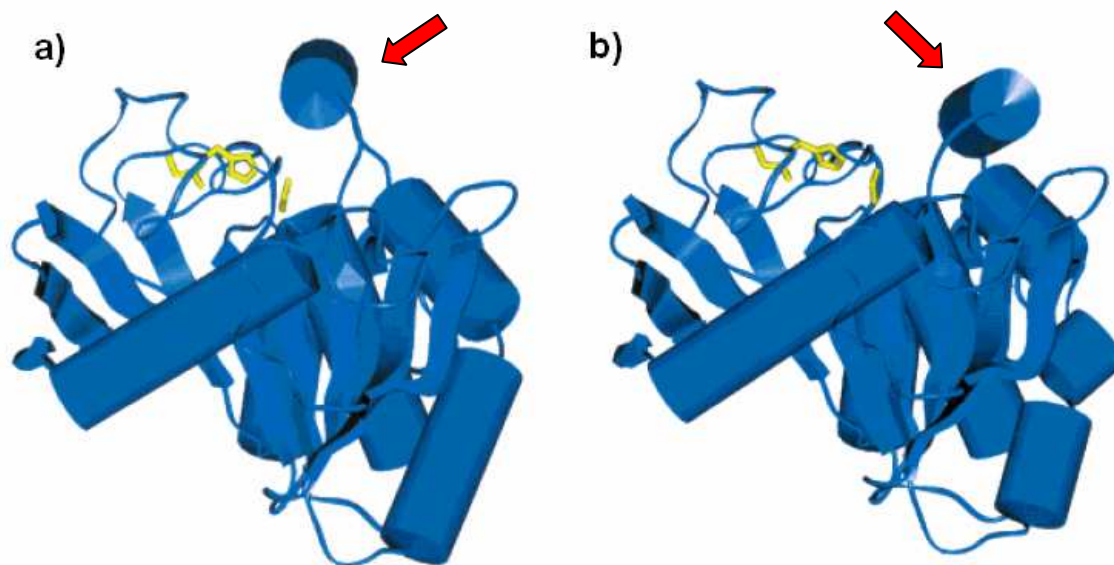
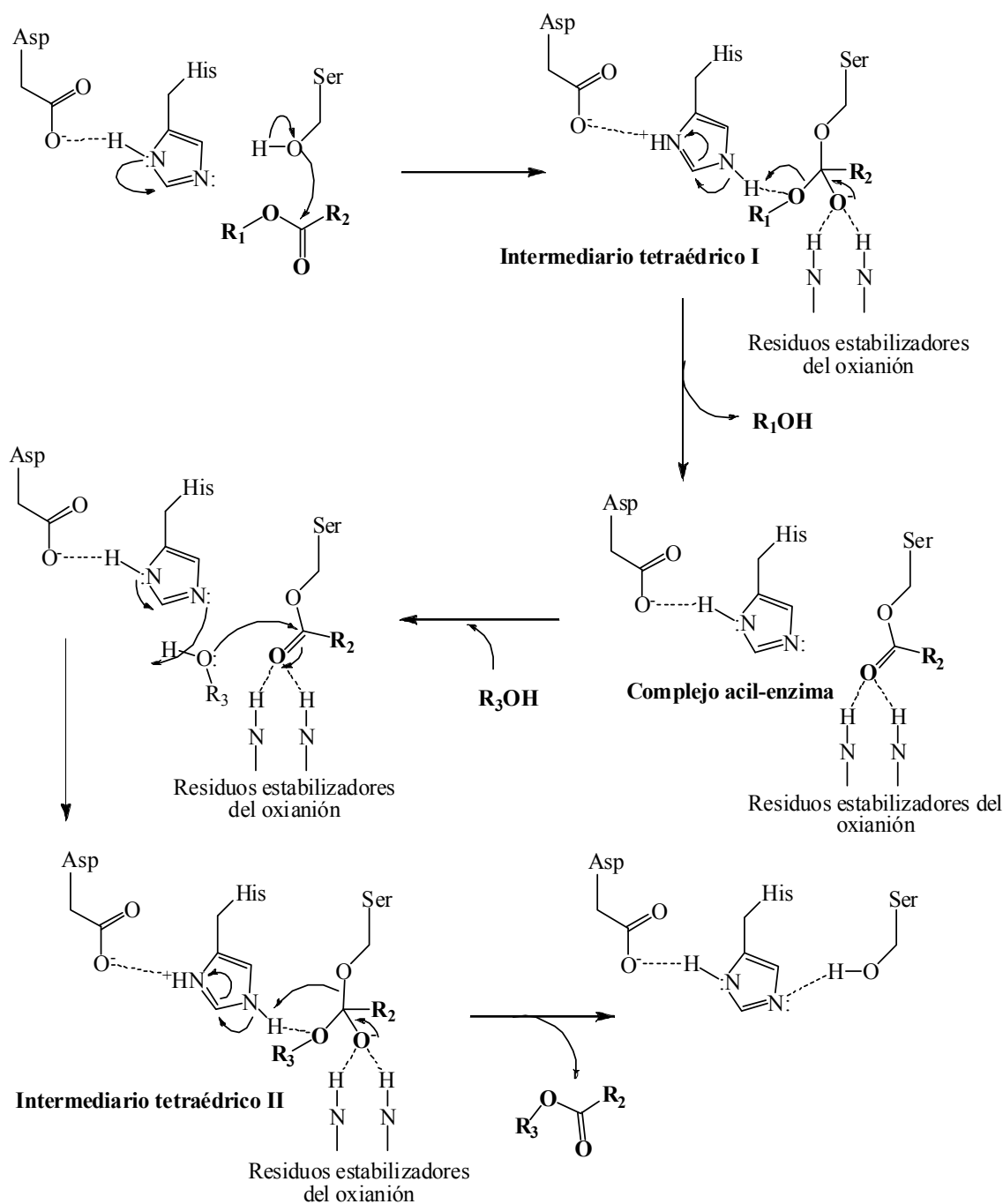


Figura 7. Estructura de la lipasa de *Mucor miehei*. La flecha indica la posición de la tapadera. a) forma cerrada b) forma abierta. (Imagen tomada y editada de Schmid y Verger).⁹¹

En el primer paso del mecanismo catalítico, el sustrato que presenta un grupo éster, accede al centro activo de la enzima donde el carbonilo es atacado por el hidroxilo de la serina formando un primer intermediario de estructura tetraédrica. En este proceso, el grupo hidroxilo de la serina cede el protón que es captado por el nitrógeno imidazólico del residuo de una histidina adyacente. Dicha histidina queda cargada positivamente y esta carga es estabilizada por la carga negativa del aspartato o glutamato vecinal. La carga negativa que se habría originado por la pérdida de un protón en la serina sufre una transposición, y se ubica en el oxígeno del grupo que originalmente formaba el carbonilo. Este oxianión es estabilizado por residuos vecinales en el entorno del centro activo de la enzima. En el segundo paso, se rompe el intermediario tetraédrico, debido a que el protón presente en el residuo de imidazolio de la histidina se transfiere a la cadena del alcohol que formaba el éster inicial. De esta manera se libera una molécula de alcohol y el resto de la molécula original queda unido al centro activo de la enzima en forma de un complejo acil-enzima.



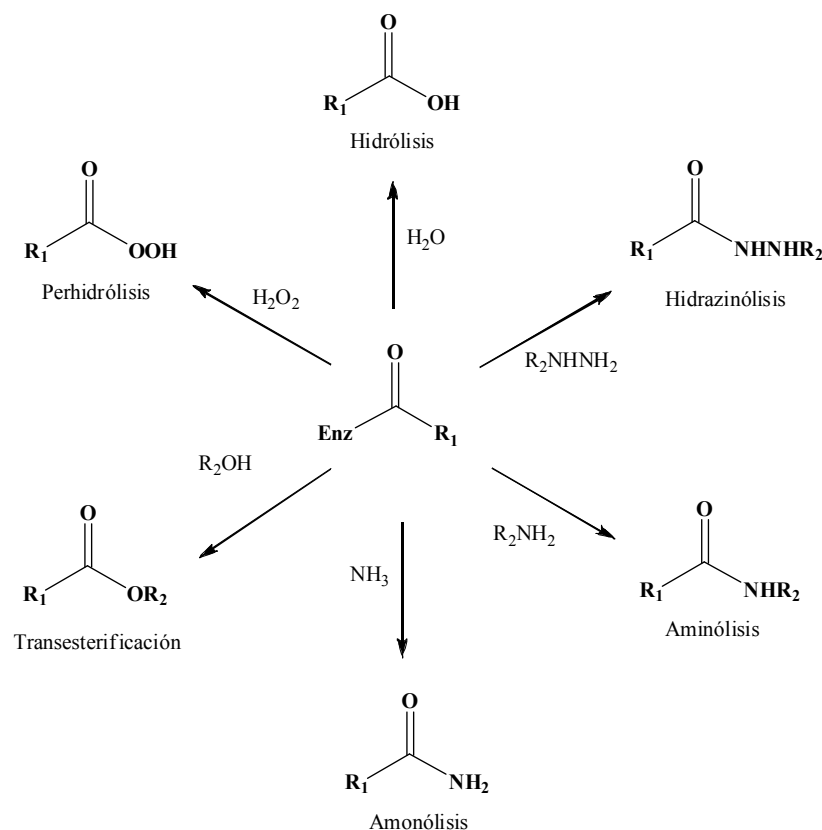
Esquema 5. Mecanismo catalítico de las lipasas

Este complejo de acil-enzima es atacado por una tercera molécula nucleofílica cuya identidad química no está limitada a los grupos alcohol, sino que puede variar y con ello dar lugar a la formación de distintos tipos de síntesis. Cuando, en este paso, el grupo entrante es una molécula de agua, se lleva a cabo la hidrólisis, como suele ocurrir en los sistemas biológicos. Este nucleófilo realiza un ataque sobre el carbonilo del complejo acil-

enzima dando lugar a la formación de un nuevo intermediario tetraédrico como el del primer paso. Finalmente, el sistema tetraédrico colapsa cuando ocurre una segunda protonación sobre el oxígeno de la serina, dando lugar a la liberación de una nueva molécula (por lo general un ácido graso) y la restructuración del centro activo a su forma original.

1.3.3.2. Utilidad sintética de las lipasas

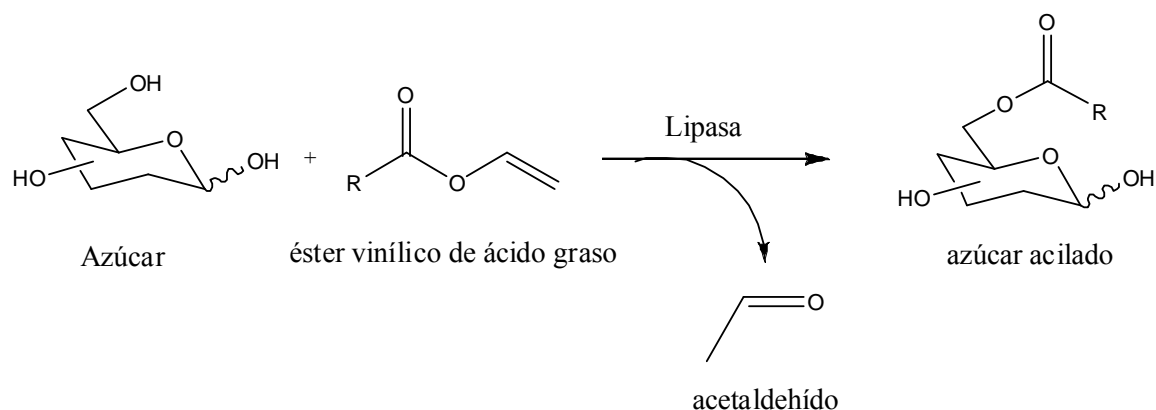
Dado que las lipasas no restringen el ataque nucleofílico a un único tipo de sustratos, existe la posibilidad de obtener gran variedad de productos, mediante la adecuada selección de nucleófilos. En su función más natural, las lipasas utilizan agua para generar la hidrólisis de este complejo acil enzima dando lugar a la liberación de ácidos grasos,⁹² sin embargo se han reportado numerosas reacciones con otros sustratos, tales como alcoholes par obtener reacciones de transesterificación,⁹³ aminas para dar lugar a la aminólisis,⁸⁶ el uso de amoniaco para realizar reacciones de amonólisis,⁹⁴ el uso de peróxido de hidrógeno para realizar perhidrólisis⁹⁵ y el uso de hidracina, para la hidrazinólisis.⁹⁶ (Esquema 6)



Esquema 6. Posibles reacciones que pueden llevarse a cabo en función de la naturaleza del nucleófilo utilizado para la ruptura del complejo acil-enzima.

1.3.3.3. Lipasas en la síntesis de glicoconjugados:

Dadas las numerosas ventajas de las lipasas como biocatalizadores, éstas enzimas se han utilizado en la síntesis de glicoconjugados, su finalidad fue en un inicio generar surfactantes biodegradables al sintetizar ésteres de azúcares, mediante la acilación del azúcar con ácidos grasos,¹⁷⁵⁻¹⁷⁷ sin embargo también se han medido sus actividades como agentes antimicrobianos contra organismos como *Bacillus subtilis*, *Bacillus stearothermophilus* y *Escherichia coli*, lo que convierte a este tipo de compuestos en sustancias con interés terapéutico.¹⁵⁰⁻¹⁵² Para la acilación de azúcares por lo general se utilizan ácidos grasos activados en forma de ésteres vinílicos,^{97, 98} de ésta manera la reacción se vuelve completamente irreversible, pues el grupo vinílico saliente tautomeriza para formar acetaldehído (Esquema 7). La tabla 3, hace una reseña de algunas de las lipasas empleadas en la síntesis de azúcares acilados por distintos autores, en dicha tabla se puede constatar que la posición predominante suele ser el hidroxilo del carbono 6 del azúcar y que la enzima más utilizada en este tipo de síntesis suele ser la lipasa de *Candida antarctica* (CAL), principalmente su lipasa B (CAL-B), sin embargo otras enzimas como la de *Candida rugosa* (CRL) y la de *Thermomyces lanuginosus* (TL), también han sido utilizadas.



Esquema 7. Representación de la acilación selectiva de un azúcar (en posición 6) a partir de un éster activado catalizada por una lipasa.

La selección adecuada de un donador para obtener un síntesis en condiciones sostenibles, es un factor a tener en cuenta, en este caso, de los doce principios de la química verde antes mencionados,⁶ los principios 1, 2, 3, 10 y 12 aplican principalmente en el uso de reactivos donadores en las reacciones enzimáticas de esterificación. Bajo esta perspectiva los donadores de acilo más sostenibles son los ácidos carboxílicos ya que resultan poco tóxicos y fáciles de eliminar, mientras que los donadores activados suelen dar paso a subproductos

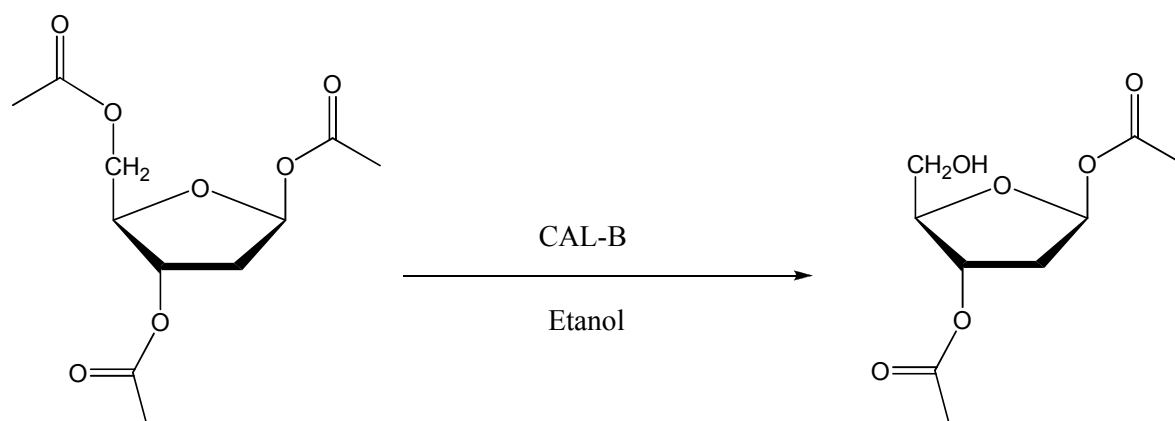
como por ejemplo el acetaldehído que resulta menos benigno desde una perspectiva ambiental, sin embargo, los donadores más sostenibles resultan ser poco reactivos, requieren remover al agua del medio y poseen un equilibrio desfavorable en la síntesis, otros donadores relativamente verdes son los anhídridos cíclicos (antes que los anhídridos de cadena abierta), posteriormente los trihaloésteres y finalmente los ésteres enólicos como el laurato de vinilo.⁹⁹

Tabla 3. Reportes de algunas lipasas utilizadas en la síntesis de ésteres de azúcares acilados con ácidos grasos.

Enzima	Acilante	Azúcar	Pocisiones aciladas	Referencia
CRL	Acetato de vinilo	6-metil- <i>O</i> -Tritil- β -D-glucopiranosido	2 y 3	Palocci y col. ¹⁰⁰
CAL	Butanoato de etilo	Sacarosa Trehalosa Maltosa Maltulosa,	6 y 6' 6 y 6' 6 6, 6' y 1'	Woudenberg van Oosterom y col. ¹⁰¹
	Dodecanoato de etilo	Sacarosa Trehalosa Maltosa	6 y 6' 6 y 6' 6	
CAL-B	Laurato de vinilo	Sacarosa Maltosa Glucosa	6, 6' 6' 6	Ferrer y col. ¹⁰² Ferrer y col. ¹⁰² Ganske y Bornscheuer. ⁹⁷
	Palmitato de vinilo	Sacarosa	6, 6' y 1'	Ferrer y col. ¹⁰²
	Ácido palmítico	D-frutofuranosa	1	Sabeder y col. ¹⁰³
	Ácido láurico	D-frutofuranosa	1	
TL	Laurato de vinilo	Sacarosa Maltosa Glucosa	6, 6' y 1' 6' 6	Ferrer y col. ¹⁰²
	Palmitato de vinilo	Sacarosa	6, 6' y 1'	

Simbología: *Candida antarctica* (CAL), lipasa B de *Candida antarctica* (CAL-B), lipasa de *Candida rugosa* (CRL), lipasa de *Thermomyces lanuginosus* (TL).

Finalmente, uno de los enfoques recientemente utilizados de las lipasas en la obtención de azúcares funcionalizados, es el inverso a la acilación. Gudiño y colaboradores,¹⁰⁴ han publicado la desacetilación asimétrica de pentafuluronósidos peracetilados, utilizando CAL-B en presencia de etanol. Los resultados han mostrado que la lipasa muestra una preferencia para la desacetilación de la posición 5 de cada azúcar, dando lugar al hidroxilo libre, según se muestra en el esquema 8.



Esquema 8. Desacetilación asimétrica de 1,3,5-triacetato de 2-desoxi- β -D-ribuofuranosa catalizada por CAL-B en etanol.

1.3.4. Síntesis enzimática de carbohidratos utilizando enzimas en presencia de disolventes verdes

El potencial de las enzimas como catalizadores ha sido ampliamente reconocido, su uso ha obtenido especial importancia en las biotransformaciones que requieren de síntesis asimétrica de compuestos enantiopuros.^{105, 106} Sin embargo la síntesis de muchos compuestos se puede ver limitada debido a que las enzimas funcionan originalmente en medios acuosos que no son del todo compatibles con algunos sustratos y/o productos orgánicos. Asimismo, el agua puede degradar muchos compuestos orgánicos dando lugar a reacciones secundarias que disminuyen el rendimiento de la síntesis deseada.¹⁰⁷

Tradicionalmente se pensó que las enzimas catalizaban reacciones exclusivamente en medios acuosos, hoy es claramente conocido que las enzimas pueden trabajar en medios no acuosos,¹⁶²⁻¹⁶⁶ en mezclas de agua con cosolventes¹⁰⁸ e incluso en disolventes orgánicos anhidros.¹⁰⁹ También existen numerosos ejemplos de biotransformaciones en líquidos

iónicos utilizando lipasas,¹¹⁰ proteasas,¹¹¹ oxidoreductasas,¹¹² peroxidasas,¹¹³ y células enteras,¹¹⁴ llegando en muchos casos a mejorar el rendimiento de las mismas respecto a los medios acuosos, aunque en ocasiones las enzimas requieren de pequeñas cantidades de agua para funcionar en medios orgánicos, como es el caso de las lipasas.¹¹⁵ Esta característica de las enzimas abre nuevas posibilidades para explorar rutas que permitan mejorar su uso.

1.3.4.1. Enzimas en disolventes orgánicos

La presencia de los disolventes puede afectar positiva o negativamente el comportamiento de las enzimas. Por ejemplo, es conocido que los disolventes miscibles en agua tienden a desnaturalizar las enzimas, este efecto ha sido explicado en el entorno disolvente-enzima, donde se modifican las interacciones no covalentes de la enzima (electrostáticas, puentes de hidrógeno, hidrofóbicas y de Van der Waals), reduciendo la conformación catalítica de la enzima.^{116, 117} Sin embargo, existen también, numerosos reportes con enzimas que catalizan reacciones en medios orgánicos y/o líquidos iónicos de forma anhidra o con pequeñas cantidades de agua con resultados incluso mejores que los obtenidos en medios acuosos.^{152, 222, 231-234} En otros casos, una adecuada proporción de agua y disolvente orgánico puede dar lugar a rendimientos esperados de producto y a cambios en la regioselectividad de la reacción.^{118, 119}

Por ello un parámetro que afecta el comportamiento de las enzimas en disolventes orgánicos es la actividad del agua. Dado que en muchos casos se ha encontrado que la actividad enzimática es más alta en medios orgánicos que en medios acuosos, Laane y colaboradores,¹²⁰ correlacionaron la actividad de las enzimas con la hidrofobicidad del disolvente, expresada como Log P, el cual es el logaritmo del coeficiente de reparto para un determinado compuesto entre una fase acuosa y una fase orgánica de 1-octanol.^{159, 160} Estos autores, han explicado tal fenómeno, como las distorsiones que se ocasionan en las monocapas de agua adyacentes en la superficie de la enzima debido a la adición del disolvente orgánico.

Poco después, Zaks y Klibanov,¹²¹ lograron demostrar, mediante el uso de tres enzimas completamente distintas, que la cantidad de agua unida a la enzima es la misma, y por ello, cuando se utilizan disolventes orgánicos hidrofílicos, es necesario utilizar altas cantidades de agua en el sistema, puesto que existe competencia entre el disolvente y la enzima por las

moléculas de agua disponibles, ya que las moléculas de agua adheridas a la superficie de la enzima resultan esenciales en su actividad.¹²²

Finalmente, otro de los parámetros que afecta notablemente a las enzimas es el pH, el cual a primera vista no tiene mayor significado en disolventes orgánicos, sin embargo resulta determinante en la actividad de las enzimas (sobretudo las liofilizadas, precipitadas o deshidratadas), ya que las enzimas tienden a guardar una memoria del pH, que obedece a la conformación estructural relacionada al último pH al cual fueron expuestas antes de ser sometidas al secado. De esta forma una enzima liofilizada en agua destilada, luego de haber sido expuesta a un determinado valor de pH conservará la misma estructura tridimensional de ese valor de pH en el agua y en la forma anhidra, que luego será expuesta a disolvente orgánico.^{190, 209, 210}

1.3.4.2. Galactosidasas en disolventes verdes

Las galactosidasas son enzimas que tradicionalmente han sido utilizadas en medios acuosos tamponados tanto para las reacciones de hidrólisis como de síntesis. Sin embargo el uso de disolventes o cosolventes con este tipo de enzimas es un tema poco explorado. No obstante existen algunos estudios de β -galactosidasas en presencia de mezclas de disolventes orgánicos. Por ejemplo la β -galactosidasas de *E. coli* y *Kluyveromyces fragilis* han sido caracterizadas en mezclas de hasta 50% v/v donde en la mayoría de los disolventes utilizados (acetona, acetonitrilo, monoglima, diglima, triglima y tetraglima entre otros) presentaron menos del 40% de actividad (medida como velocidad máxima).¹²³ Se conocen también datos de *A. oryzae* en la síntesis de glicoconjugados con fenil etanol.¹²⁴

Una de las enzimas de interés para este trabajo es la β -galactosidasa de *B. circulans*, de ella se sabe que tolera disolventes orgánicos como acetonitrilo, acetona y *terc*-butanol en bajas cantidades debido a que puede ser desnaturalizada, sin embargo en *terc*-butanol al 10% parece mostrar mejores resultados.¹²⁵ Por otra parte, muchos de los datos medidos no corresponden a disolventes que puedan considerar verdes, sino disolventes orgánicos tradicionales. En contraposición a la literatura, recientemente, en nuestro grupo de han desarrollado estudios de síntesis de disacáridos y glicoconjugados en presencia de disolventes derivados del glicerol¹⁸ con la β -galactosidasa de *E. coli*.^{20, 159}

Los líquidos iónicos ofrecen una serie de ventajas en la síntesis de carbohidratos debido a que pueden ser solubles o insolubles, permitiendo obtener distintos procesos de transporte, separación y purificación de los carbohidratos,²¹⁵⁻²¹⁷ sin embargo su uso junto con las β -galactosidasas es todavía un campo limitado. Se tiene constancia de que las β -galactosidasas de *B. circulans*,¹²⁶ *Pyrococcus furiosus*,¹²⁷ y *Aspergillus oryzae*,¹²⁸ han sido empleadas en presencia de líquidos iónicos. En el primer caso se han obtenido mayores rendimientos en la síntesis del disacárido (LacNAc) y mayor estabilidad de la enzima,¹²⁶ mientras que la enzima de *Pyrococcus furiosus*, ha presentado moderados incrementos en la actividad sintética de la enzima (aproximadamente un aumento del 10% respecto a las condiciones en agua) pero también se han presentado efectos inhibitorios a altas concentraciones del líquido iónico.¹²⁷ Respecto a la enzima de *Aspergillus oryzae* se han obtenido mayores velocidades de hidrólisis del sustrato donador (*o*NF- β -Gal).¹²⁸

1.3.4.3. Lipasas en disolventes verdes:

Las lipasas utilizadas en reacciones de síntesis por lo general requieren medios anhidros, debido a que en presencia de agua tiende a favorecer las reacciones de hidrólisis.²⁵⁰⁻²⁵³ Existen estudios de lipasas con actividad en disolventes verdes (aunque pocos de ellos se refieren a síntesis de carbohidratos), entre ellos: disolventes fluorados,^{221, 222} metil tetrahidrofurano,¹²⁹ y derivados del glicerol.⁹³ Sin embargo la síntesis de glicoconjugados tiene como principal dificultad la solubilidad de los sustratos, pues los azúcares no se tienden a disolver en medios poco polares como ocurre con los agentes acilantes.⁹⁷ Esto ha llevado a desarrollar este tipo de acilaciones enzimáticas principalmente en presencia de disolventes orgánicos polares (puros o en mezclas) como 2-metil-2-butanol,^{130, 131} dimetilsulfóxido,¹⁰² etil metil cetona,¹⁰³ piridina^{226, 227} y el *terc*-butanol.¹⁴⁰⁻¹⁴²

Las reacciones de síntesis de azúcares acilados en condiciones más sostenibles, que han sido desarrolladas con las lipasas, se han realizado en presencia de líquidos iónicos, con la ventaja de que los líquidos iónicos no tienden a desnaturalizar las enzimas como ocurre con disolventes orgánicos de polaridad similar.^{234, 261, 262} No existe una regla empírica que permita predecir los posibles comportamientos de las lipasas en líquidos iónicos, sino que cada enzima se comporta de manera distinta en un determinado líquido iónico. Sin embargo para una misma enzima, es posible encontrar tendencias relacionadas con su actividad hidrolítica y sintética en función de las cadenas orgánicas del líquido iónico y en general de

su catión y su anión.^{169, 195} Las mezclas de disolventes orgánicos con agua o con líquidos iónicos suelen ser muy utilizadas, en estas mezclas la superficie de contacto es determinante debido a que las lipasas suelen trabajar en la interfase.¹³²⁻¹³⁴

En el año 2003 se publicó la síntesis de 1-metil-6-tritil-glucosas y 1-metil-6-tritil-galactosas acetiladas, en presencia de cloroformo, tetrahidrofurano y líquidos iónicos: hexafluorofosfato de 1-butil-3-metil imidazolio ([Bmim][PF₆]) y hexafluorofosfato de 1-metoxietil-3-metil imidazolio ([Bmoem][PF₆]) utilizando la CRL, en este caso la acetilación dio como resultado varios productos, pero más selectiva en presencia de líquidos iónicos que en presencia de disolventes orgánicos.¹³⁵

En el año 2005 Ganske y Bornscheuer^{130, 173} optimizaron la síntesis de ésteres de glucosa con ácido láurico, mirístico y palmítico, siendo el mejor agente acilante el ácido láurico. La enzima utilizada fue la CAL-B y el medio óptimo fue una mezcla de *terc*-butanol con un 40% de líquido iónico, utilizando: [Bmim][PF₆] y [Bmim][BF₄] (tetrafluoroborato de 1-butil-3-metil imidazolio) a 60°C luego de 72h. Al parecer bajo estas condiciones la enzima es mucho más selectiva y realiza la acilación del hidroxilo del carbono 6 de la glucosa.^{207, 268} En años posteriores se ha continuado el uso de CAL-B como biocatalizador para este tipo de reacciones utilizando LIs sobresaturados de azúcares,¹³⁶ mezclas de LIs¹³⁷ y ultrasonidos para mejorar las emulsiones y superficie de contacto de las lipasas.¹³⁸

1.4. HERRAMIENTAS PARA EL ESTUDIO RACIONAL DEL EFECTO DE DISOLVENTES VERDES

Los disolventes pueden ejercer numerosos efectos sobre las enzimas, que en muchos casos no parecen comprenderse del todo. El entorno químico de una enzima y en particular su centro activo, durante una reacción química, es muy complejo. Existen iones (en caso de que se use un medio tamponado), sustratos y disolventes, valores de pH y temperaturas, que afectan las interacciones entre las distintas partes de la reacción. Dada la complejidad del sistema, pueden darse interacciones tales como: enzima-disolvente, enzima-sustrato, sustrato-sustrato, sustrato-disolvente. Por ello resulta difícil comprender la globalidad de factores que determinan el resultado final de una reacción enzimática. En la actualidad, existen distintas herramientas tecnológicas que permiten medir en condiciones bastante

sensibles y exactas, algunas de las interacciones que pueden darse durante una determinada reacción química.

En el caso de las reacciones biocatalizadas, se requiere desarrollar sistemas de alta sensibilidad y bajo consumo de muestras, dentro de las opciones actualmente existentes para estudiar las interacciones moleculares se pueden citar: la resonancia magnética nuclear (RMN) por medio de la técnica STD (“*saturation transfer difference*” transferencia de la diferencia en saturación) que permite determinar los sitios de unión entre dos moléculas que interactúan entre sí,¹³⁹⁻¹⁴¹ la resonancia por plasmón de superficie (SPR, por sus siglas en inglés), una herramienta que permite inmovilizar macromoléculas como proteínas y fluir sobre ellas una solución de analito o ligando, cuantificando la asociación y disociación entre ambas,²⁷⁵⁻²⁷⁸ la microcalorimetría por titulación isotérmica (ITC por sus siglas en inglés) que permite obtener datos como constante de unión, estequiometría, entalpía y entropía.²⁷⁹⁻²⁸¹ Finalmente una herramienta que permite predecir, interpretar o explicar las posibles interacciones en ambientes microscópicos, es la bioinformática a través del modelado molecular y el “*docking*”.²⁸²⁻²⁸⁵ Para el presente estudio se analizarán las estrategias de SPR, ITC y modelado molecular, como herramientas para el análisis de los resultados a presentar.

1.4.1. Resonancia de plasmón de superficie

La técnica de SPR se basa en la inmovilización de una molécula que actúa como receptora sobre una superficie de oro funcionalizado con un grosor nanométrico, esta superficie constituye en sí misma un biosensor. Los biosensores de SPR (Figura 8) detectan cambios en el índice de refracción en las proximidades de su superficie de oro utilizando luz polarizada, en la interfaz entre el soporte sólido y el medio líquido. La molécula inmovilizada pasa a formar parte de la superficie que es irradiada con un haz de luz, cuyo índice de refracción se modifica al fluir una disolución de ligando sobre la superficie ya que al fluir la disolución de analito se obtiene una asociación, mientras que al dejar de fluirla y pasar un medio distinto al analito (por ejemplo tampón) se obtiene una disociación, este efecto se mide en unidades de respuesta abreviadas como “RU” por sus siglas en inglés, normalmente se asocia el valor de 1 RU como el equivalente a 1 pg/mm². Durante el experimento de SPR,^{142, 143}

Los ensayos se llevan a cabo en presencia de un blanco, que es una superficie con las mismas características que la superficie original antes de inmovilizar al receptor, para obtener un valor que luego es restado a los ensayos de la superficie activada. La información obtenida genera un grafico denominado sensograma, en el cual se analizan los valores obtenidos entre la celda de interés y la celda control (figura 9).¹⁴² Con esta técnica se pueden obtener datos de cinéticas dentro de una gran variedad de interacciones macromoleculares, que incluyen sistemas de alta y baja afinidad entre el receptor y el ligando.¹⁴⁴

El análisis cinético de la interacción, requiere eliminar los posibles falsos positivos, mediante la sustracción de la respuesta obtenida con la superficie de control. El modelo más simple es el de la interacción uno-uno (Langmuir) que puede ser aplicado en la mayoría de casos, sin embargo en determinadas situaciones, los procesos de asociación y disociación son tan rápidos que no permiten recoger información, lo que obliga a alcanzar el estado estacionario de la interacción, y con ello determinar la constante de disociación en el equilibrio (K_D) o de asociación (K_A) de la interacción entre analito y ligando.¹⁴⁵

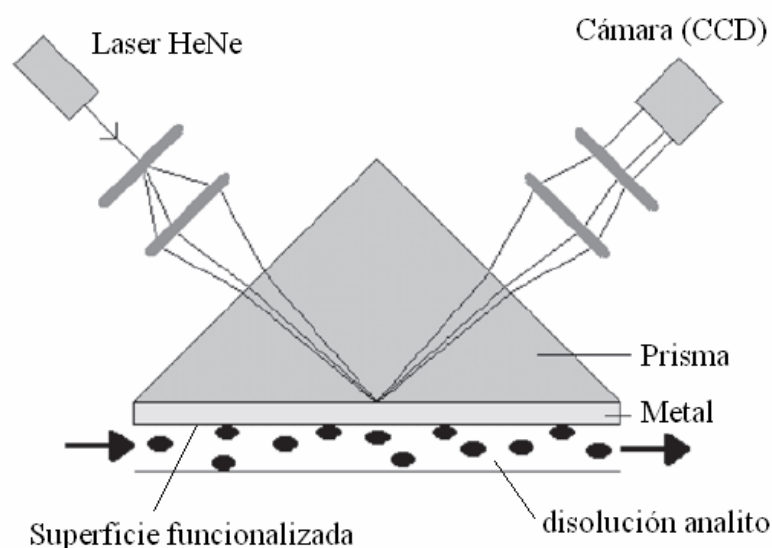


Figura 8. Esquema del funcionamiento de un SPR. La luz incide sobre la superficie funcionalizada que está en contacto con una disolución de analito que fluye sobre ella. El cambio del índice de refracción es medido y con ello la interacción entre el receptor y el ligando. (Figura tomada de Pattnaik, 2005).¹⁴³

Parte de los avances en la técnica de SPR, radican en el diseño de los experimentos, en la actualidad existe gran variedad de chips funcionalizados, que ofrecen diversas alternativas para inmovilizar el receptor pero además existe la posibilidad de preparar chips en el

laboratorio que luego son evaluados en el SPR,²⁸⁹⁻²⁹¹ esto permite ampliar y mejorar las opciones de inmovilización y de cuantificación de interacciones moleculares. Gracias a los avances existentes y las numerosas opciones de trabajo en el SPR, muchas interacciones entre proteínas y carbohidratos han llegado a ser cuantificadas mediante ésta técnica,²⁹²⁻²⁹⁷ sin embargo no hay constancia de estudios que hayan relacionado las interacciones enzima-disolvente mediante SPR, pese a la probada utilidad de ésta herramienta.

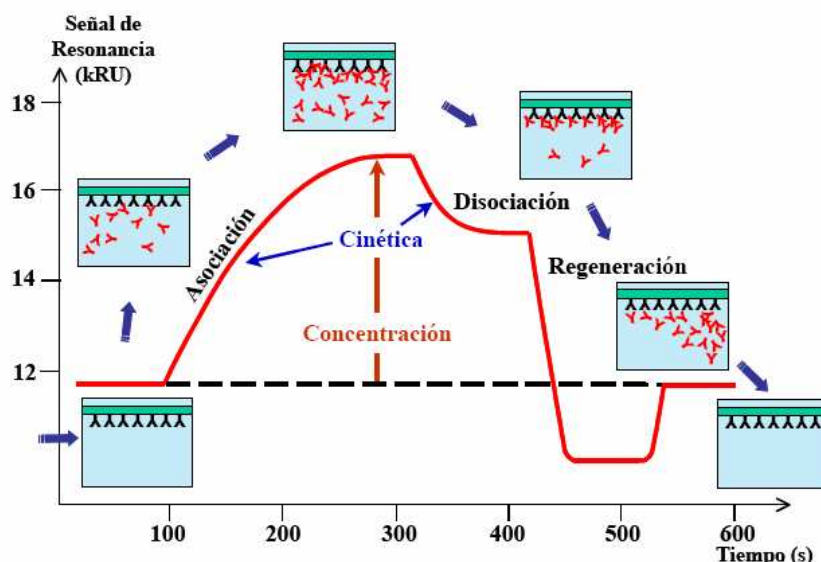


Figura 9. Diagrama general de un sensograma obtenido con el SPR.

1.4.2. La microcalorimetría por titulación isotérmica

De las técnicas actualmente disponibles para determinar interacciones moleculares, la ITC es la única que permite determinar, además de la constante de afinidad del sistema y su constante de equilibrio, los valores termodinámicos del sistema como lo son los cambios de entalpía (ΔH) y cambios de entropía (ΔS).¹⁴⁶ Esta técnica mide directamente la energía relacionada a un sistema por la mezcla de componentes, la reacción se crea por una inyección de un ligando que absorbe o libera calor de forma proporcional a la unión entre el ligando y el receptor, la propia inyección funciona como agitador del sistema, garantizando la difusión de los componentes, las adiciones sucesivas de ligando generan picos cada vez menores, debido a la saturación del receptor. Los datos obtenidos generan un diagrama de titulación en donde el área de cada pico representa el calor desprendido o absorbido por el sistema (Figura 10).¹⁴⁷

La ITC se ha empleado para medir diversos tipos de interacciones con proteínas, entre ellas moléculas pequeñas como la epicatequina¹⁴⁸ y moléculas de mayor tamaño como las pectinas,¹⁴⁹ se han evaluado glicomiméticos con potenciales actividades antimicrobianas basándose en su interacción con las enzimas,¹⁵⁰ y se han estudiado las interacciones por adhesión entre algunas toxinas y péptidos.¹⁵¹ Esta técnica puede utilizarse en sistemas donde la afinidad entre el receptor y el ligando es baja, se considera que es baja cuando los valores del parámetro de Wiseman “*c*” menores a 10.¹⁵²

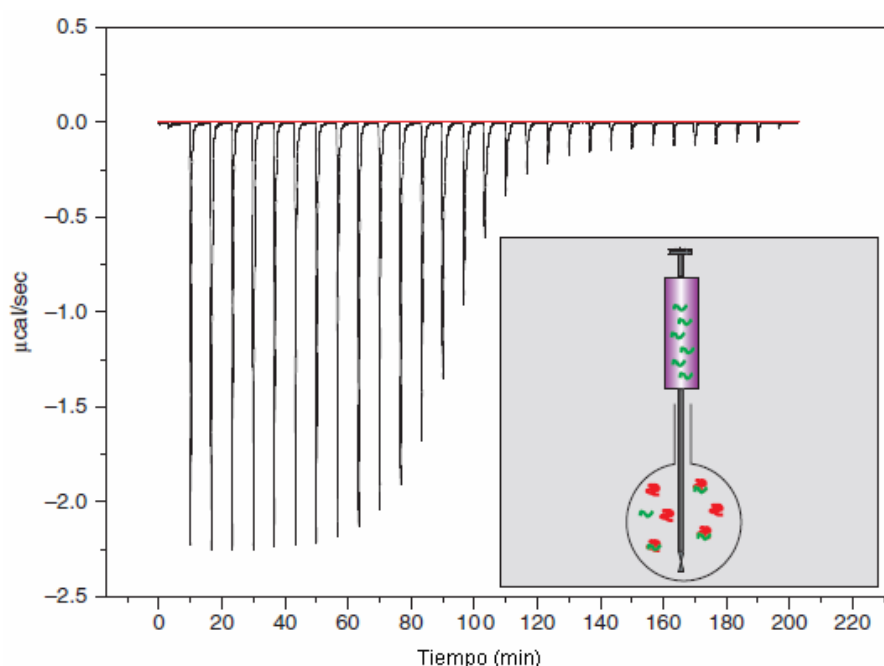


Figura 10. Experimento representativo de ITC. Una inyección de ligando es depositada en la cámara de reacción, donde la jeringa actúa a la vez como agitador. El sistema desprende calor que es medido como el área de cada pico. Las adiciones sucesivas de ligando permiten alcanzar una concentración en la que el calor desprendido es casi constante demostrando la saturación del receptor. (Imagen tomada de Leavitt, S. & Freire 2001).¹⁴⁷

También se ha utilizado la ITC como herramienta para determinar valores cinéticos como la constante de Michaelis-Menten o la constante de catálisis, incluso en sistemas con altas concentraciones de proteínas.¹⁵³ Sin embargo los estudios de ITC con enzimas relacionadas con la síntesis de oligosacáridos como las β -galactosidasas, son al parecer inexistentes y más aún para explicar las interacciones de la enzima con el medio de reacción.

1.4.3. Dicroísmo circular

El dicroísmo circular es una técnica espectroscópica ampliamente utilizada para análisis quiróptico de moléculas. Su uso implica el análisis de la interacción diferencial de las

moléculas con la luz polarizada hacia la derecha y la izquierda. En ausencia de un campo magnético solo las moléculas quirales pueden dar lugar a este tipo de interacción con la luz polarizada.¹⁵⁴ Las proteínas son moléculas que poseen una determinada quiralidad dado que están compuestas por *L*-aminoácidos, lo que permite que cada molécula de proteína presente un espectro propio de absorción de dicroísmo circular.

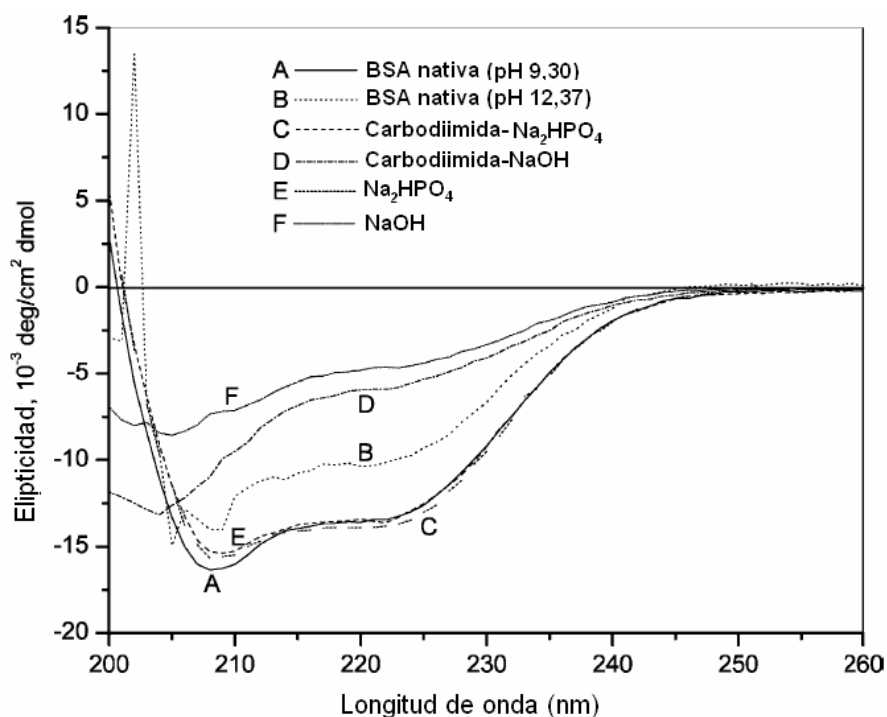


Figura 11. Espectro de dicroísmo circular para albúmina de suero bovino (BSA) sometida a distintos tratamientos. (Figura tomada y traducida de Peng y col. 2004)¹⁵⁵

Los plegamientos de mayor importancia en de la cadena polipeptídica que determinan la estructura secundaria de las proteínas son las α -hélices y las β -láminas, que se estabilizan por puentes de hidrógeno intra e inter-cadena, respectivamente. Estas conformaciones se caracterizan por ángulos diedros los cuales se repiten a lo largo de la cadena polipeptídica: -57° , -47° en las α -hélices que determinan formas cilíndricas y -120° , $+120^\circ$ en las β -láminas que forman estructuras planas.¹⁵⁴

El uso de dicroísmo circular para determinar los plegamientos de las proteínas en alfa hélice, beta láminas y formas discontinuas ha sido confirmado partiendo de estructuras cristalizadas de proteínas conocidas. Con esta base, Chen y colaboradores¹⁵⁶ diseñaron el primer algoritmo para estimar estructuras secundarias de proteínas a partir de los espectros

de dicroísmo circular en la región del espectro ultravioleta lejano. En la actualidad esta técnica puede ser utilizada para predecir cambios en la conformación de la enzima producto del uso de disolventes, cambios de temperatura, pH u otros factores, y con ello ofrecer una posible explicación a los fenómenos conformacionales que pueden ocurrir sobre las proteínas (figura 11)³⁰⁷⁻³¹¹

1.4.4. Fluorescencia

La fluorescencia es el resultado de la emisión de luz fotoinducida por un grupo fluoróforo, este fenómeno requiere de una excitación por medio de una determinada longitud de onda que luego es relajada por distintos grupos presentes en la molécula y que finaliza con la emisión de luz con un máximo de emisión en una longitud de onda distinta a la inicial.¹⁵⁷ En el caso de las proteínas la emisión por fluorescencia está directamente relacionada con el triptófano,¹⁵⁸ de esta manera, una alta presencia de triptófanos garantizará un espectro de emisión fácil de medir incluso en equipos de baja sensibilidad.

Los cambios en el entorno químico de un triptófano modifican también su espectro de emisión y con ello los valores de longitud de onda en los que se obtienen máximos de fluorescencia se modifican. Esta información permite obtener datos sobre la estructura terciaria de una proteína y permite medir el efecto de factores externos como el pH o agentes químicos sobre su estructura terciaria (particularmente el entorno de los triptófanos), ya que la presencia de sustancias que afectan la estructura de la proteína repercutirá directamente en su espectro de fluorescencia.^{179, 182}

1.4.5. Herramientas de Bioinformática

Las simulaciones por ordenador han probado ser herramientas eficaces para entender las estructuras de las proteínas y sus dinámicas con el medio.^{150, 197, 198} Existen varios programas informáticos, bases de datos y servidores que ofrecen numerosas herramientas para analizar y predecir características estructurales de las proteínas como por ejemplo: punto isoeléctrico, puentes disulfuro, plegamientos, etc. Estas predicciones se realizan en su mayoría basándose en algoritmos creados por homología con información de proteínas previamente caracterizadas.

1.4.5.1. Bases de datos

Dentro de las bases de datos de mayor importancia para el análisis de proteínas se pueden citar las siguientes:

NCBI: El NCBI es la base de datos del “*Nacional Center for Biotechnology Information*” de los Estados Unidos de América. Su dirección web es la siguiente:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

Esta es una base de datos con múltiples funciones, ofreciendo: base de datos de literatura (PubMed, especializada en biomedicina), nucleótidos, herramientas para análisis de secuencia (GenBank) y herramientas para el diseño de estructuras tridimensionales, entre otras. De ellas, una de las más utilizadas para el análisis comparativo de proteínas es el alineamiento de secuencias proteicas por medio de la herramienta “BLAST” (“*Basic Local Alignment Search Tool*”),¹⁵⁹ la que permite obtener valores porcentuales de identidad entre dos ó mas proteínas.

Protein Data Bank (PDB): El PDB,¹⁶⁰ es una base de datos online del “*Research Collaboratory for Structural Bioinformatics (RCSB)*” de los Estados Unidos de América, que acepta el depósito de estructuras tridimensionales de proteínas. Su dirección web es la siguiente:

<http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>

Las macromoléculas disponibles en esta base de datos pueden encontrarse aisladas o bien en forma de complejos: proteína-proteína, proteína-ácido nucleico y macromolécula-ligandos. Los modelos depositados provienen fundamentalmente de difracción de rayos-X y algunos de espectroscopía de RMN. A cada una de las entradas se les asigna un código de identificación formado por 4 caracteres denominado “PDB ID”.

ExPASy (Expert Protein Analysis System): Esta es una herramienta online del “*Swiss Institue of Bioinformatics*” que permite determinar características de una determinada

enzima a partir de su secuencia de aminoácidos en formato “*Fasta(Fast Alignment)*”¹⁶¹. Su dirección web es la siguiente:

<http://web.expasy.org/>

Las herramientas más populares en la predicción de propiedades de proteínas son “ProtParam”¹⁶² y “SWISSPROT”.¹⁶³ En la primera de ellas se obtienen varios parámetros estimados a partir de una secuencia en formato fasta, tales parámetros son: peso molecular, punto isoeléctrico teórico, composición de aminoácidos, composición atómica, coeficiente de extinción molar, vida media estimada, índice de inestabilidad, índice alifático y promedio de hidrofobicidad. En la segunda de ellas se indexan todas las proteínas secuenciadas y contiene múltiples referencias a otras bases de datos.

CAZy: Para el presente trabajo, CAZy (“*Carbohydrate Active Enzymes*”)¹⁶⁴ es una base de datos de gran utilidad, ya que ofrece información especializada en visualización y análisis de información genómica, estructural y bioquímica en enzimas activas sobre carbohidratos. La página ha sido desarrollada por el grupo de glicogenómica en arquitectura y función de las macromoléculas Biológicas de la Universidad del Mediterráneo en Provenza, Francia. Su dirección web es la siguiente:

<http://www.cazy.org/>

La base de datos CAZy inició como página web en 1998 y en ella se describe las familias de los módulos catalíticos estructuralmente relacionados y los hidratos de carbono vinculados (o dominios funcionales) de las enzimas que degradan, modifican o crean enlaces glucosídicos.

1.4.5.2. Modelado molecular y docking

Con la gran cantidad de proteínas registradas en las distintas bases de datos, muchas de ellas en formato 3D a partir de las estructuras cristalizadas correspondientes, existen múltiples oportunidades para interpretar y predecir resultados entre proteínas y distintas moléculas con las cuales interaccionan éstas.

Para proteínas cuya estructura cristalina no está disponible, se requiere alinear correctamente la secuencia de aminoácidos con proteínas de similitud estructural y funcional similar, este trabajo se puede realizar con distintos servidores que ofrecen esta herramienta, como por ejemplo: MUSCLE.¹⁶⁵ La homología puede ser estudiada por herramientas ofrecidas en servidores como SWISS-MODEL^{166, 167} y “CPHmodels-3.0”.¹⁶⁸ En otros casos, se pueden generar predicciones basadas en la interpretación de estructuras cristalizadas y analizadas previamente por difracción de rayos X, como ha sido el caso de la β -galactosidasa de *T. thermophilus* A4, cuya estructura cristalizada ha sido analizada por medio de software para comparar su centro activo con el de otras enzimas como la β -galactosidasa de *E. coli*.¹⁶⁹

El “docking” es la principal herramienta de trabajo en las simulaciones por ordenador que pretenden explicar fenómenos relacionados con catálisis enzimática. Esta herramienta se basa en el anclaje de moléculas sobre las proteínas con las que interaccionan. Su estudio requiere de contemplar numerosos parámetros como: tiempo de simulación puentes de hidrógeno, fuerzas coulombimétricas, efectos estéricos de las moléculas, etc. Del anclaje obtenido se realizan superimposiciones que simulan las distancias entre los átomos de la proteína cuando está anclada o cuando está libre, permitiendo analizar la flexibilidad o rigidez de la misma.¹⁷⁰⁻¹⁷²

De los paquetes de software que permite realizar distintas pruebas en sistemas donde se simula un complejo enzima-ligando uno de los más usados es el programa Autodock,¹⁷³ el cual permite simular la unión covalente de los ligandos, utilizando tanto un método basado en la red de acoplamiento y una modificación de la técnica de cadenas laterales flexibles. Sin embargo se pueden mencionar otros paquetes informáticos como PRODRG server,¹⁷⁴ Massively Parallel Quantum Chemistry Program (MPQC),¹⁷⁵ GROMOS y GROMACS.¹⁷⁶

Se han realizado estudios de docking que han caracterizado la familia I de las glicosilhidrolasas (que hidrolizan enlaces β -glicosídicos, incluyendo β -galactosas). De este trabajo se encontraron ocho residuos que participan en el centro activo de la enzima: Glu191, Thr194, Phe205, Asn285, Arg336, Asn376, Trp378, and Trp465 (este último en la β -glucosidasa de *Zea mays*).¹⁷⁷ Brás y col.¹⁷⁸ han realizado el docking de la enzima TTP0042 de *T. thermophilus* en los que una molécula de monosacáridos como la glucosa ha sido anclada en una proteína para mimetizar en términos bionfórmáticos el intermediario

glicosil-enzima característico de las glicosidasas durante la síntesis de enlaces glicosídicos (ver Esquema 1).

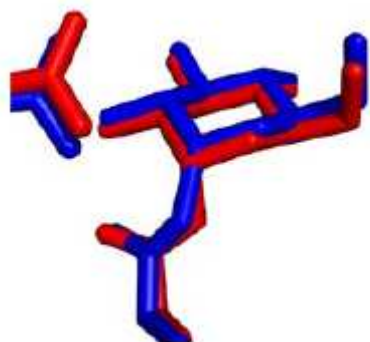


Figura 12. Superimposición de la estructura cristalográfica y la estructura obtenida por modelling, del centro activo de la enzima TTP0042 de *T. thermophilus* anclado con glucosa en la formación del intermediario de reacción. (Tomado de Brás y col.)¹⁷⁸

El estudio realizado por Brás y col.¹⁷⁸ demuestra que las predicciones teóricas obtenidas por técnicas de modelado molecular coinciden con los datos experimentales obtenidos por cristalografía (figura 12). Esto confirma la utilidad de esta herramienta y su fiabilidad para la determinación de interacciones estructurales enzima-carbohidrato.

1.5. INMOVILIZACIÓN DE ENZIMAS

La inmovilización es una técnica que confina una enzima catalíticamente activa dentro de un sistema de reacción dando lugar a un derivado insoluble que luego puede ser reutilizado,¹⁷⁹⁻¹⁸¹ dentro de las características ventajosas de este tipo de biocatalizadores se puede mencionar que: se mejora la estabilidad de la enzima, abre la posibilidad de reutilizar el catalizador (incluso de forma continua), el catalizador se puede separar con facilidad de la mezcla, se previene la contaminación por proteínas en el producto final y se evitan fácilmente contaminaciones microbianas en el sistema.¹⁸²

La inmovilización supone ventajas en términos económicos para las industrias que utilizan biocatalizadores, ya que la posibilidad de reutilizar una enzima hace que la productividad del catalizador (definida como kg de producto obtenidos por kg de enzima) sea más alta y con ello reduce los costos de manufactura, siendo un ejemplo de ello la producción de ácido 6-aminopenicilánico, cuya productividad es de 600 kg por kg de enzima.¹⁸³⁻¹⁸⁵ Por lo anterior, si desde una perspectiva de la química verde, el uso de biocatalizadores es considerado como ambientalmente amigable,^{49, 50} el uso de enzimas inmovilizadas puede resultar aún más sostenible, dada la posibilidad de reutilizar el biocatalizador.

1.5.1. Tipos de inmovilización de enzimas

Sheldon¹⁸⁵ categoriza la inmovilización de enzimas en tres grandes grupos: I) inmovilización sobre un soporte previamente elaborado, II) captura en matrices orgánicas o inorgánicas (encapsulamiento) y III) entrecruzamiento de proteínas. En el presente trabajo se han empleado dos de ellas: la inmovilización sobre soportes y la inmovilización por entrecruzamiento, las cuales se describen a continuación.

1.5.1.1. Inmovilización por unión a un soporte:

La inmovilización sobre un soporte es un proceso en el que la enzima se une a un material previamente manufacturado (normalmente una macromolécula) formando un derivado estable, los soportes pueden ser de fuentes naturales como el quitosano,¹⁸⁶⁻¹⁸⁹ polímeros naturales químicamente modificados como glioxil agarosas,²⁹⁰⁻²⁹² soportes orgánicos funcionalizados¹⁹⁰⁻¹⁹⁵ o inorgánicos como la silica mesoporosa.¹⁹⁶⁻¹⁹⁸

El proceso se puede realizar de distintas maneras: adsorción física por atrapamiento en cavidades polares,¹⁹⁹ adsorción por fuerzas de Van der Waals,²⁰⁰ adsorción por fuerzas iónicas,²⁰¹ acomplejamiento metálico,^{202, 203} ó por unión covalente.¹⁹² De éstos, la unión covalente se perfila como una opción muy utilizada debido a la ventaja de que la unión enzima-soporte es irreversible. Para el presente trabajo se han elegido soportes orgánicos funcionalizados con superficies macroporosas y glioxil agarosas como soportes para inmovilizar distintas enzimas de interés en la síntesis de oligosacáridos y glicoconjugados.

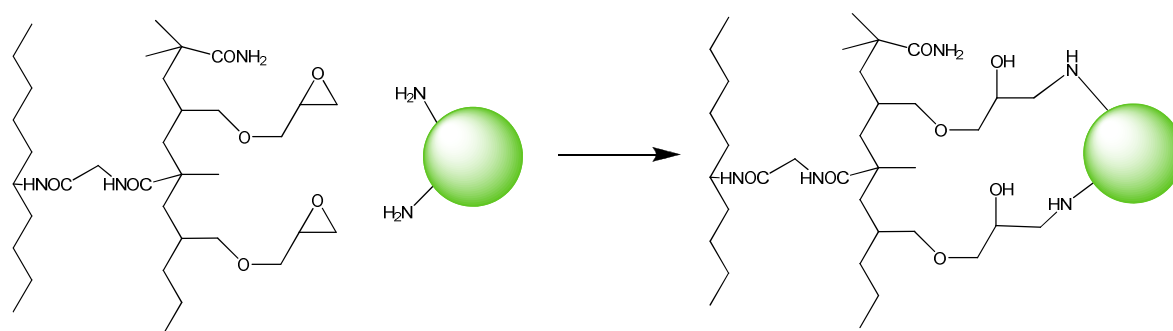
Polímeros sintéticos macroporosos:

Dentro de la gran variedad de polímeros que pueden obtenerse por síntesis química, el uso de polímeros macroporosos cobra gran auge debido a las múltiples propiedades que les hacen más competitivos respecto a aquellos polímeros que inmovilizan enzimas sobre su superficie.²⁰⁴⁻²⁰⁶ Este tipo de polímeros pueden ser comerciales como: “Epoxy Sepabeads” y “Eupergit C”, o bien, pueden ser sintetizados en el laboratorio a partir de los monómeros. Sin embargo, es importante mencionar, que existen numerosos ejemplos de inmovilizaciones sobre polímeros macroporosos no comerciales sintetizados en el laboratorio con distintas enzimas: glucoamilasa de *A. niger*,²⁰⁷ penicilina G acilasa,²⁰⁸

invertasa de *Saccharomyces cerevisiae*,²⁰⁹ lipasa de *C. rugosa*²¹⁰ y lipasa B de *C. antarctica*,²¹¹ lo que demuestra su amplio uso en el campo de la inmovilización de enzimas.

El soporte Sepabeads está constituido por resinas acrílicas que forman partículas esféricas macroporosas con grandes valores de superficies internas y alta congruencia geométrica con proteínas.^{212, 213} Algunas de las enzimas inmovilizadas sobre este tipo de soportes son: fructosiltransferasa de *A. aculeatus*²¹⁴ y la β -galactosidasa de *B. circulans*.²¹⁵ El Eupergit C[®], está constituido por pequeñas esferas (“perlas”) macroporosas con un diámetro de 100–250 μm , es estable mecánica y químicamente y puede resistir valores de pH desde 0 hasta 14.²¹⁶ Sobre este soporte se han inmovilizado diferentes tipos de enzimas, entre ellas algunas glicosidasas como: β -glucosidasa de *Aspergillus niger*,²¹⁷ α -galactosidasa de *A. oryzae*,²¹⁸ β -galactosidasa de *B. circulans*.^{258, 259} También se ha inmovilizado la lipasa de *C. rugosa*.²¹⁹

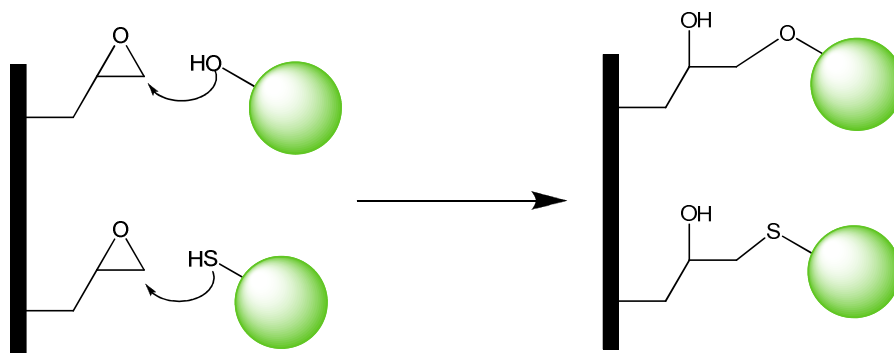
La inmovilización sobre Sepabeads y Eupergit se realiza mediante los grupos epóxido libres que tiene el polímero en su superficie y los grupos amino libres de las enzimas (generalmente de residuos de lisinas) que permiten realizar un ataque nucleofílico que finaliza con la unión del sistema soporte-enzima mediante una amina secundaria.^{185, 192} (Esquema 9)



Esquema 9. Inmovilización de una enzima sobre Eupergit C[®].¹⁸⁵

Una de las desventajas de utilizar epóxidos como grupos reactivos en la superficie de un soporte durante la inmovilización, es su baja selectividad química, ya que pueden interactuar con otros residuos libres de aminoácidos como: tioles presentes en las cisteína

e hidroxilos de serinas, treonina y tirosina formando enlaces covalentes con ellos. Lo que puede distorsionar la estructura terciaria de la enzima debido a múltiples puntos de anclaje (Esquema 10).



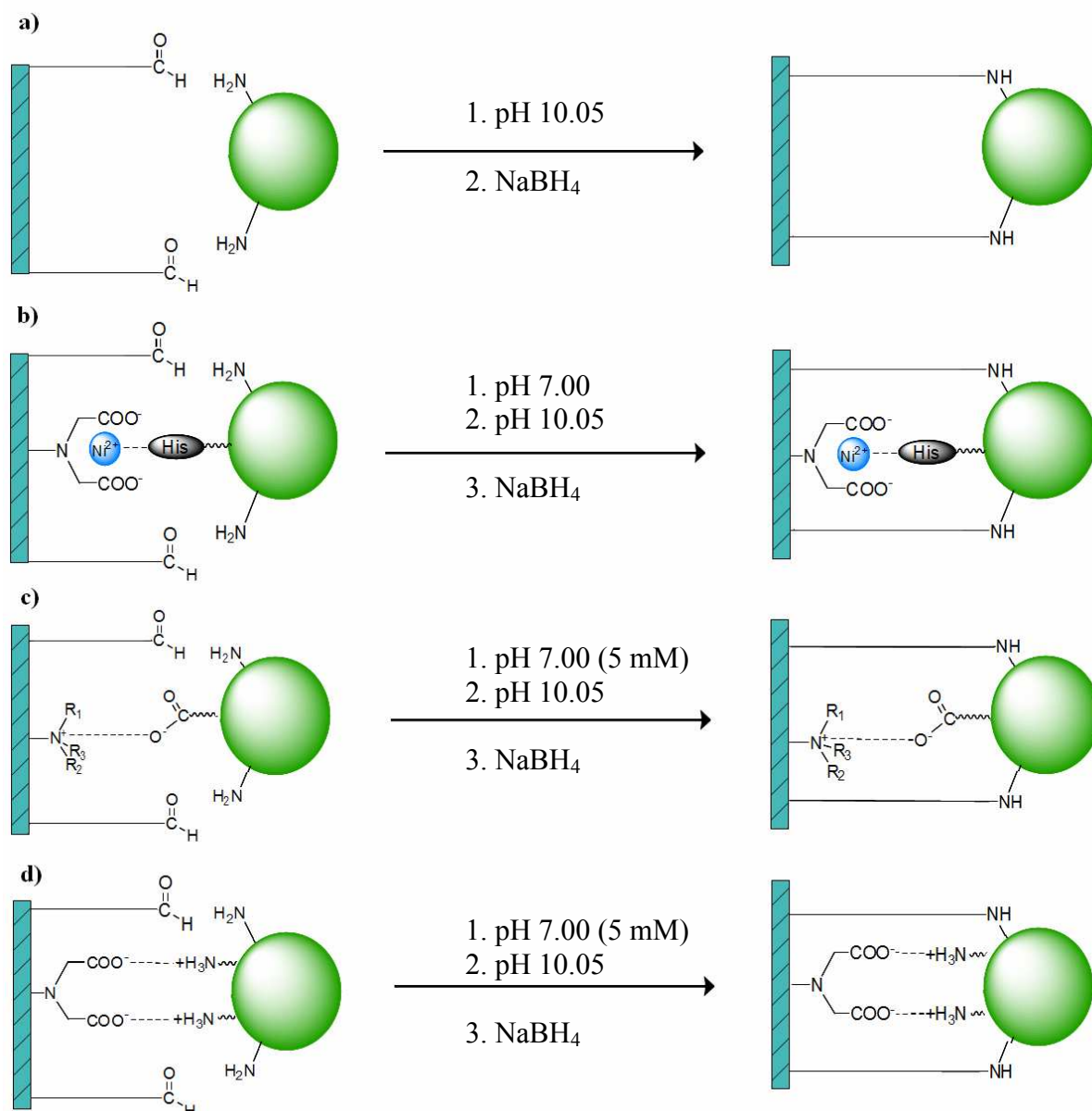
Esquema 10. Inmovilización covalente de enzimas sobre epóxidos mediante residuos hidroxilos o tioles.

Glioxil agarosas:

Las glioxil agarosas son soportes muy versátiles para inmovilizar enzimas. Se basan en un biopolímero (la agarosa) que ha sido modificado para funcionalizar su superficie con grupos aldehído.²²⁰ Los aldehídos libres tienen la ventaja de que pueden reaccionar de forma específica con las aminas para formar iminas mediante mecanismos del tipo Bases de Schiff. Lamentablemente este tipo de enlaces requieren un pH igual o superior a 10.0, lo que hace ésta técnica poco compatible con algunas enzimas sensibles a los cambios de pH. Posterior a la formación de la imina, el sistema requiere la reducción de la amina a imina, lo cual se consigue por adición de bajas cantidades de borohidruro sódico. Una vez finalizada la reducción, se filtra la mezcla y se lava con agua o con tampón, hasta que obtiene un derivado inmovilizado hidrófilo (esquema 11).²²¹

Recientemente, el grupo de investigación dirigido por el Profesor José Manuel Guisán, ha desarrollado diversas estrategias de inmovilización con glioxil agarosas, para disminuir el tiempo de reacción a pH alcalino. El enfoque se basa en la atracción soporte-enzima mediante una funcionalización de las glioxil agarosas. Existen glioxil agarosas funcionalizadas con cationes metálicos como el níquel (II) que interaccionan con enzimas recombinantes que poseen extremos polipeptídicos con múltiples histidinas (*histag*). También se han desarrollado soportes funcionalizados con grupos carboxilo que se cargan de forma negativa a pH 7.0, para atraer enzimas con cargas positivas, por lo que se requiere

un punto isoeléctrico de la enzima mayor a 7.0. Finalmente, existen soportes funcionalizados con derivados de tipo amonio cuaternario que están cargados positivamente a pH 7.0, los cuales requieren que la enzima esté cargada negativamente a ese valor de pH, y por lo tanto su punto isoeléctrico sea menor a 7.0.²²²



Esquema 11. Estrategias de inmovilización sobre glioxil agarosas. a) glioxil agarosa tradicional b) glioxil agarosa funcionalizada con níquel (II) y ácido iminodiacético (IDA-Ni²⁺) c) Agarosa funcionalizada con superficie catiónica d) agarosa funcionalizada con superficie aniónica.

Las enzimas termófilas se caracterizan por ser más rígidas y termoestables que sus homólogos en los mesófilos,²²³ en términos generales, se consideran como proteínas muy

resistentes a todo tipo de condiciones, pues sus secuencias de aminoácidos están creadas de forma que minimizan los impactos del calor, por ello es factible considerarlas como enzimas potencialmente resistentes a disolventes orgánicos y cambios de pH.²⁷¹⁻²⁷³ Bajo esta perspectiva, la inmovilización de dichas enzimas mediante glioxil agarosas no parece suponer un problema, pese al elevado pH que se emplea durante el anclaje. En el caso de la enzima TTP0042 de *T. thermophilus*, esta enzima se ha clonado con un extremo de seis histidinas en el extremo amino terminal de la enzima.^{13, 70} Por lo que es posible considerarla para su inmovilización con las distintas estrategias de inmovilización desarrolladas con las glioxil agarosas.

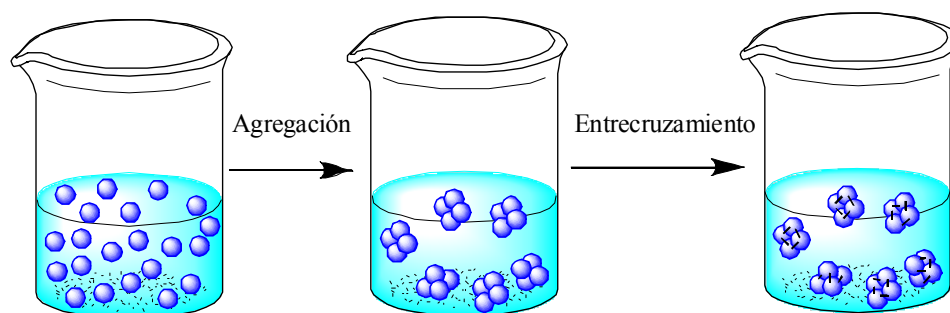
1.5.1.2. Inmovilización por agentes entrecruzantes

En el caso de los polímeros anteriormente descritos, la inmovilización se basa en los grupos aminos libres de las enzimas que son susceptibles de reaccionar con otros grupos funcionales, tales como los epóxidos o los aldehídos. Sin embargo, existe la posibilidad de utilizar sustancias que mediante un doble grupo funcional en la misma molécula actúen como moléculas de enlace o espaciadores, que puedan unir dos moléculas de enzimas entre sí, como es el glutaraldehído.^{224, 225}

Los primeros sistemas de enzimas entrecruzadas fueron obtenidos con glutaraldehído en 1964, para ser sometidos a estudios de difracción de rayos X, los cuales requerían de la formación de estructuras cristalinas, sin embargo, de forma inesperada, conservaron su actividad catalítica. Más adelante estos cristales de enzimas entrecruzadas (CLEC's por sus siglas en inglés: "*crosslinked enzyme crystals*") fueron empleados en la industria y finalmente comercializados. Sin embargo, en la práctica actual, este tipo de cristales son poco utilizados, básicamente por la laboriosidad que requiere producirlos y los altos niveles de pureza requeridos por la enzima.^{285, 330, 331}

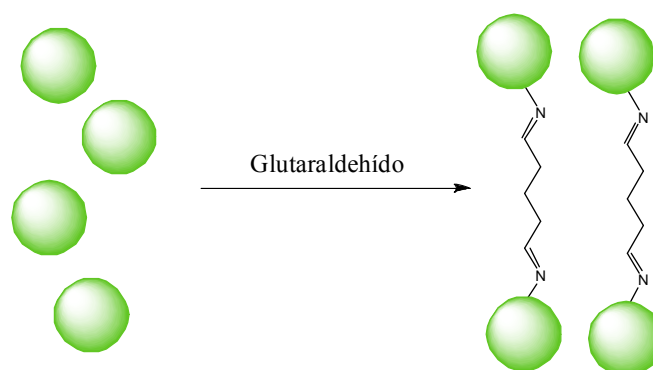
Por otra parte, se sabe que las enzimas tienden a agregarse bajo determinadas circunstancias: en presencia de disolventes en los que se muestran insolubles, valores de pH inusuales, adiciones de sal, valores bajos o altos de temperatura, entre otros. Cuando las enzimas se agregan, su estructura terciaria permanece intacta y por lo general no ocurre la desnaturalización, es entonces cuando se puede añadir el agente entrecruzante y al agregado

de enzimas entrecruzadas se le llama “CLEA” (por sus siglas en inglés: “*crosslinked enzyme aggregates*”, esquema 12).²²⁶

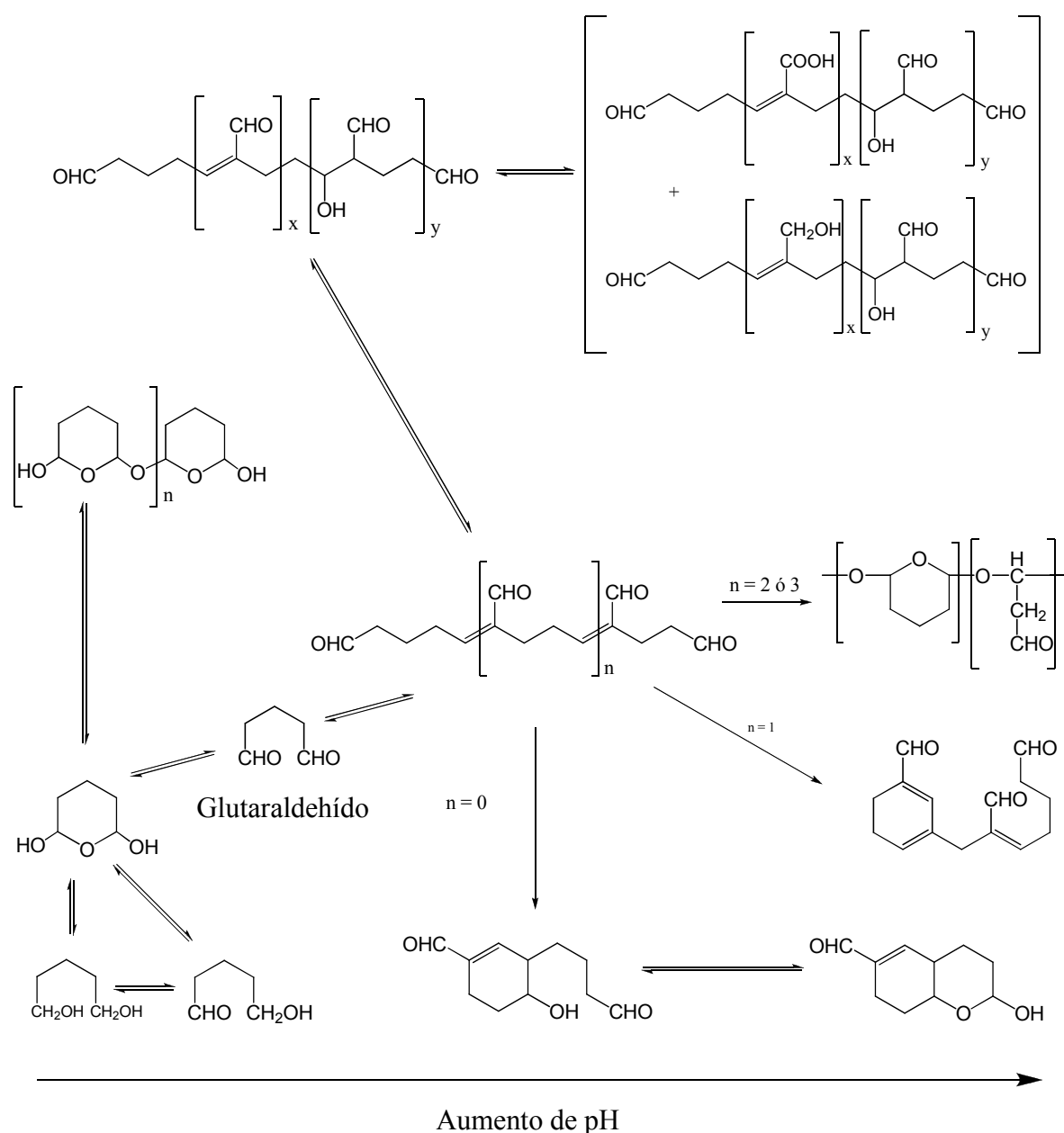


Esquema 12. Representación de la síntesis de CLEA's.

Tradicionalmente se ha llegado a pensar que el glutaraldehído tiende a formar iminas con los residuos de las lisinas de las proteínas mediante un mecanismo de base de Schiff (esquema 13), pero esta teoría no es del todo correcta, en buena parte por que las bases de Schiff mantienen un equilibrio reversible entre la forma libre del aldehído y la forma de imina, de ser así, las reacciones con glutaraldehído deberían ser reducidas con algún agente como el borohidruro de sodio para evitar este equilibrio imina-aldehído. En su lugar, muchas de las reacciones de entrecruzamiento finalizan por adición de glutaraldehído.



Esquema 13. Representación esquemática del concepto tradicional de entrecruzamiento con aldehído.



Esquema 14. Detalle de las posibles formas del glutaraldehído en disolución acuosa y su relación con el pH de la mezcla según la revisión de Migneault y col.²²⁷

La química del glutaraldehído es un tema controvertido, puesto que su estructura en disolución acuosa no está limitada a una única forma monomérica. Por eso en los últimos cuarenta años han aparecido varias publicaciones sobre su comportamiento en este medio.^{227, 228} En el año 2004, Migneault y col.,²²⁷ presentaron una de las últimas revisiones sobre el tema y expusieron un total de once posibles formas moleculares en las que el glutaraldehído puede encontrarse en medios acuosos, muchas de ellas, dependientes del pH de la disolución. Estas estructuras se muestran en el esquema 14. De esta información es

posible preveer que el concepto tradicional de entrecruzamiento de enzimas por un mecanismo de bases de Schiff es algo probable pero no en forma exclusiva, sino que existen múltiples formas de unión química en los enlaces formados con este agente espaciador.

Finalmente, algunos aspectos que deben ser tomados en cuenta a la hora de elaborar CLEA's son los fenómenos de difusión, transporte, rigidez y agente precipitante, ya que todos ellos pueden afectar positiva o negativamente el resultado final de la enzima inmovilizada. Respecto al tema de transporte y fenómenos difusionales, este se puede modificar mediante el uso de proteínas complementarias que aumente el espacio de entrada y salida de los productos. Se han realizado estudios utilizando la albumina de suero bovino (BSA) como proteína complementaria en el CLEA, de forma que en condiciones óptimas facilite la adecuada difusión de sustratos y productos al centro catalítico de las enzimas que forman el CLEA.²²⁹

Mientras que respecto al uso de agentes precipitantes, este es un tema que depende de la naturaleza de la enzima y su tolerancia a disolventes orgánicos ó inorgánicos. Algunos de los agentes utilizados para realizar la precipitación de enzimas son: 2-propanol, etanol, acetona, acetonitrilo, tetrahidrofurano (THF), dioxano, dimetil sulfóxido (DMSO, polietilenglicol, 1,2-dimetoxietano (DME), alcohol terbutílico y el sulfato de amonio.²⁴¹⁻²⁴⁴

Finalmente, las concentraciones de entrecruzante pueden afectar la naturaleza de las enzimas y su actividad catálítica en el CLEA,²³⁰ por lo que siempre es recomendable realizar estudios sobre el efecto de la concentración del agente entrecruzante.²³¹

1.5.2. Síntesis de oligosacáridos y glicoconjugados utilizando enzimas inmovilizadas

1.5.2.1. Uso de glicosidasas y glicosintasas inmovilizadas

Existen numerosos estudios de glicosidasas y glicosintasas inmovilizadas sobre distintos soportes y que luego han sido caracterizadas y analizadas en actividades sintéticas para obtener oligosacáridos, entre ellas se tiene constancia de las mencionadas en la tabla 4. De las enzimas mencionadas en dicha tabla se pueden señalar algunos datos importantes sobre las ventajas de utilizar glicosidasas y glicosintasas inmovilizadas. Por ejemplo, la β -glicosintasa de *Streptomyces E383A* se ha inmovilizado sobre un soporte de níquel (II)-

sefarosa y conserva 93% de actividad luego de nueve ciclos de uso, retiene un 83% de actividad luego de 54 días de almacenamiento a 4°C en tampón fosfato, la enzima libre se empleó en la síntesis de distintos *p*-nitrofenil disacáridos donde los mayores rendimientos alcanzados (77%) se obtuvieron en la síntesis de *p*NF-β-Glc-(1→3)-Glc, para la misma síntesis, la enzima inmovilizada sobre sefarosa-níquel (II) aumento los rendimientos hasta un 95%.²³²

Tabla 4. Algunas glicosidasas y glicosintasas inmovilizadas de utilidad en la síntesis de disacáridos y glicoconjugados.

Enzima	Soporte	Condiciones de reacción	Productos	Referencias
<i>Streptomyces E383A</i> β-glicosintasa	Sefarosa-Ni ²⁺	1 mM donador (<i>p</i> -nitrofenil) 5 mM aceptor Tampón fosfato 50mM pH 7.0, 35°C	Glcβ(1→3)Glc	Faijes y col. ²³²
β-galactosidasa <i>Kluyveromyces lactis</i>	Duolita A 568 (resina defenol formaldehído)	15.9% m/v lactosa 40°C, MgCl ₂ 0,01M 12 W, microondas Tampón fosfato 50mM pH 6.5	GOS ^a	Maugard y col. ²³³
β-galactosidasa <i>B. circulans</i> (Biolacta N°5)	Eupergit C	Citrato/fosfato de sodio 50 mM, pH 5.00 Gal-β- <i>p</i> NF (0,33M) GlcNAc (2,48 M)	Galβ(1→4)GlcNAc	Hernaiz y Crout. ²³⁴
β-galactosidasa <i>B. circulans</i> (3-β-gal)	CNBr-sefarosa	Fosfato de sodio 100 mM, pH 6.00 Gal-β- <i>p</i> NF GalNAc GalNAc-α-Bn	Galβ(1→3)GalNAc Galβ(1→3)GalNAc-α-Bn	Naundorf y col. ²³⁵
β-Galactosidasa de <i>A. oryzae</i> .	Partículas magnéticas F ₃ O ₄ Quitósano	Lactosa 60% m/v Tampón acetato de sódio, 50 mM pH 4.6	GOS ^a	Pan y col. ²³⁶
β-glucosidasa de almendra	Perlas de alginato de calcio	0,25-1,25 mmol de tiamina 1 mmol D-glucosa 24-120h, 68°C	2- <i>O</i> -Glc-Tiamina	Ponrasu y col. ²³⁷

^a Galactooligosacáridos

Otro ejemplo de enzima inmovilizada es la β-galactosidasa de *Kluyveromyces lactis* que ha sido inmovilizada en Duolite A-568.²³³ Las reacciones se han realizado con radiaciones de microondas, en tampón y en presencia de algunos disolventes orgánicos como hexanol,

hexanodiol, glicerol, dietilenglicol dietil éter. Tanto la enzima libre e inmovilizada han sido comparadas en cuanto a su actividad en la síntesis de galactooligosacáridos, dando mejores resultados la enzima inmovilizada, ya que el equilibrio de reacción se desplaza hacia la síntesis cuando se usa la enzima inmovilizada mientras que en medio acuoso se favorece la hidrólisis del donador. Otra enzima inmovilizada que ha sido utilizada en presencia de disolventes orgánicos es la β -galactosidasa aislada de la almendra²³⁷ (aislada por precipitación de los taninos)²³⁸ e inmovilizada sobre perlas de alginato de calcio.²³⁹ Esta enzima ha sido utilizada en presencia de tampón y mezclas de di-isopropil éter, a distintos valores de pH mostrando un comportamiento relativamente predecible en función de las condiciones del medio.²³⁷

Un factor importante en la inmovilización de enzimas es el aumento de la estabilidad y de la termoestabilidad, así por ejemplo, dos enzimas diferentes provenientes de *B. circulans* se han inmovilizado en soportes como el eupergit C²⁴⁰ y la sefarosa activada con bromuro de cianógeno, en ambos casos con una importante retención de la actividad enzimática y con un aumento de la estabilidad.²³⁵ En el primer caso la enzima utilizada favorece la síntesis de enlaces $\beta(1\rightarrow4)$ y en el segundo enlaces de tipo $\beta(1\rightarrow3)$. Efectos similares sobre la estabilidad se han obtenido con la β -Galactosidasa de *A. oryzae*, que ha sido inmovilizada sobre partículas magnéticas de Fe_3O_4 sobre quitosano, en este caso la inmovilización favorece la estabilidad térmica y también la estabilidad a diferentes valores de pH.²³⁶

1.5.2.2. Uso de lipasas inmovilizadas

Respecto al uso de lipasas inmovilizadas para preparar glicoconjugados, la más utilizada ha sido la CALB y CRL. De la CALB existen formas inmovilizadas disponibles comercialmente como novozyme 435 que han sido utilizadas en numerosos estudios de catálisis enzimática,⁴⁰⁷⁻⁴⁰⁹ y para la obtención de ésteres de azúcares con ácidos grasos.¹⁰² En el pasado han existido otras presentaciones de CALB inmovilizada utilizadas para este tipo de síntesis como por ejemplo chirazyme pero que han dejado de comercializarse. Se ha utilizado, además, la opción de inmovilizar las lipasas sobre polímeros comerciales como eupergit,²¹⁹ sepabeads²⁴¹ y polietilenglicol (PEG)²⁴² y soportes no comerciales.^{206, 210, 211, 243} Dado que su uso está limitado a medios de reacción anhidros o bajos en agua, la síntesis de glicoconjugados con lipasas se han realizado con otros disolventes, siendo los más conocidos dentro de la química verde: los líquidos iónicos.^{105, 148, 255}

Durante el proceso de inmovilización, no siempre se obtiene una total retención de la actividad de la enzima, así por ejemplo, al inmovilizar la lipasa de *C. rugosa* en Eupergit C, los rendimientos descritos son de un 43% respecto a la enzima libre.²¹⁹ Sin embargo, los bajos rendimientos en la retención de actividad no están correlacionados con la estabilidad, en este caso, la enzima de *C. rugosa* cambia su estabilidad térmica presentando apreciables mejoras en sus tiempos de vida media para la desactivación a 75°C, siendo 18 veces más estable que la enzima libre.

Dada la naturaleza dual de la estructura tridimensional de las lipasas,⁹⁰ una inmovilización que estabilice la forma cerrada de la enzima causará una pérdida de su actividad, mientras que una inmovilización que estabilice la lipasa en su forma de tapadera abierta, puede causar un fenómeno de hiperactivación respecto a la lipasa libre. Palomo y colaboradores han estudiado la inmovilización de las lipasas de CALB, CRL y *M. miehei* sobre glioxil agarosa, octadecil sepabeads y por entrecruzamiento con glutaraldehído. Los mejores resultados se obtuvieron con el soporte más hidrofóbico utilizado (octadecil sepabeads), llegando a registrar un fenómeno de hiperactivación (5 veces más actividad que la enzima en medio acuoso) y además mayor resistencia a disolventes orgánicos y la desactivación térmica, que han sido atribuidos a una estabilización de la estructura de tapadera abierta de la enzima en el derivado inmovilizado.²⁴⁴ esta tendencia de las lipasas a ser más estables en soportes más hidrófobos se ha repetido luego con la enzima de *C. rugosa* y de *Alcaligenes sp.* inmovilizadas sobre glioxil agarosa (activada con bromuro de cianógeno) y octil agarosa, donde este último soporte aportó los mejores resultados.²⁴⁵

Al parecer, la inmovilización de las lipasas queda en parte, determinada por las interacciones hidrofóbicas entre éstas y el soporte, para una misma enzima, como es la CALB el tipo de soporte puede dar distintos resultados. Se tiene constancia de la forma comercial de CALB conocida como novozyme 435 (soporte acrílico) tiene afinidad en la hidrólisis del isómero *S* del ácido 2-*O*-butiril-*O*-fenilacético partiendo de la mezcla racémica, mientras que la misma enzima inmovilizada sobre octil agarosa prefiere el isómero *R*.²⁴³

II. OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

El objetivo general de la presente Tesis Doctoral, es evaluar distintas aproximaciones para la obtención por vía enzimática de oligosacáridos y glicoconjugados utilizando diversos tipos de enzimas en condiciones que puedan ser consideradas como sostenibles.

Para este trabajo los objetivos específicos propuestos son los siguientes:

1. Caracterizar distintas fracciones de la enzima Biolacta N°5 (Daiwa Kasei, Japón) en su actividad sintética de disacáridos utilizando diferentes medios de reacción.
2. Evaluar la actividad enzimática de los extractos celulares de *T. thermophilus* HB27 como potenciales biocatalizadores para la síntesis de carbohidratos.
3. Analizar el comportamiento de la enzima TTP0042 de *T. thermophilus* HB27 en la síntesis de disacáridos y glicoconjugados en presencia de disolventes verdes y líquidos iónicos.
4. Inmovilizar mediante distintas aproximaciones la enzima TTP0042 y evaluar su actividad catalítica en la síntesis de disacáridos.
5. Evaluar distintas condiciones de reacción para la síntesis de glicoconjugados mediante el uso de lipasas comerciales (libres e inmovilizadas).

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. MATERIALES Y EQUIPO INSTRUMENTAL

3.1.1. Reactivos y disolventes

3.1.1.1. General

Los estándares de azúcares y otros reactivos relacionados fueron en su mayoría comprados a Sigma-Aldrich (Saint Louis, MO, USA), éstos fueron: *p*-nitrofenol (*p*NF), *p*-nitrofenil- β -D-galactopiranosido (*p*NF- β -gal), *p*-nitrofenil- β -D-glucopiranosido (*p*NF- β -glc), *p*-nitrofenil- β -D-fucopiranosido (*p*NF- β -fuc), *N*-acetil lactosamina (Gal- β [1 \rightarrow 4]-GlcNAc), *N*-acetil alolactosamina (Gal- β [1 \rightarrow 6]-GlcNAc), D-(+)-galactosa (Gal), D-(+)-manosa (man), D-(+)-fucosa (fuc), D-(+)-glucosa (glc), clorhidrato de D-glucosamina (GlcNH₂.HCl), clorhidrato de D-galactosamina (GalNH₂.HCl), *N*-acetil-D-glucosamina (GlcNAc), *N*-acetil-D-galactosamina (GalNAc), pentaacetato de β -glucosa, pentaacetato de β -galactosa, octaacetato de β -lactosa, fosfato dihidrógeno de sodio, fosfato hidrógeno de sodio, citrato de sodio, ácido cítrico, hidróxido de sodio, ácido 2-(*N*-morfolino) etanosulfónico (MES), gluaraldehído (25% en agua) y dimetoxietano. Los siguientes reactivos para electroforesis en geles de poliacrilamida (PAGE) y análisis de proteínas fueron comprados a sigma: dodecil sulfato de sodio para electroforesis (SDS), tris(hidroximetil)aminometano (Tris), glicina, persulfato de amonio (PSA), page blue 83 (tinción para geles), glicerol para uso en biología molecular y el estándar de albúmina de suero bovina 98%. Mientras que los siguientes reactivos fueron comprados a la casa comercial de BioRad: Dye Reagent (tinción para método Bradford), solución de bis acrilamida 29:1 (40%), tetrametiletilendiamina (Temed), estándares de peso molecular de electroforesis (Kaleidoscope, dual color y SDS-PAGE standards broad range). Los Chips para inmovilización de ligandos en SPR, surfactantes y el kit de unión covalente (amino coupling kit) fueron de GE Healthcare, Uppsala, Suecia.

3.1.1.2. Disolventes

Los disolventes de fuentes renovables derivados de glicerol:¹⁸ 1,3-dimetoxipropan-2-ol (GC4), 2-butoxi-3-metoxipropan-2-ol (GC5), 1-terc-butoxi-3-metoxipropan-2-ol (GC6), 1-isopropoxi-3-(2,2,2-trifluoroetoxi)propan-2-ol (GC7), 1,3-bis(2,2,2-trifluoroetoxi)propan-2-ol (GC8), 2-metoxi-1,3-bis(2,2,2-trifluoroetoxi)propano (GC9), 1-butoxi-3-isobutoxipropan-2-ol (GC10), 1,3-dibutoxipropan-2-ol (GC11), 1-(3-butoxi-2-metoxipropoxi)butano (GC12), 1,3-bis(2,2,3,3,3-pentafluoropropoxi)propan-2-ol (GC13) y 1,3-bis(2,2,3,3,4,4,4-heptafluorobutoxi)propan-2-ol (GC14), fueron proporcionados por el Prof. Dr. José I. García del Instituto de Ciencias Materiales de Aragón perteneciente al CSIC, Zaragoza.

Los derivados cíclicos del glicerol: Derivados cíclicos de glicerol: 1,3-dioxan-5-ol (G1), 5-hidroxi-1,3-dioxan-2-ona, (G2) y 2,2-dimetil-1,3-dioxolan-1-il)metanol (G3) y derivados de dimetilamida: 2-hidroxi-*N,N*-dimetilpropanamida (DMA1), *N,N*-dimetilbenzamida (DMA2), *N,N*-dimetilhexanamida (DMA3), fueron proporcionados por la empresa COGNIS IP Management GMBH (Alemania)

3.1.1.3. Líquidos Iónicos

Los líquidos iónicos: trioctilmetilamonio hexafluorofosfato bistriflimida [Troma][NTf₂], cocosalquil pentaetoxi metil amonio metil sulfato [CPMA][MeSO₄], octil metil imidazolio hexafluorofosfato [Omim][PF₆], fueron proporcionados por Prof. Dr. Pedro Lozano del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular e Inmunología de la Facultad de Química de la Universidad de Murcia. Mientras que el butil metil imidazolio hexafluorofosfato [Bmim][PF₆] y el Etil metil imidazolio tetrafluoroborato [Emim][BF₄], butil metil imidazolio tris (pentafluoroetil) trifluorofosfato [Bmim][FAP], fueron comprados a Sigma-Aldrich.

3.1.1.4. Soportes para inmovilización:

Los soportes utilizados para inmovilización fueron: Eupergit C comprado a Sigma Aldrich, soportes macroporosos funcionalizados con epóxidos que fueron preparados y caracterizados en el grupo del Prof. Dr. Ángel Rumero por el doctorando Antonio Aires

como parte de su tesis doctoral, actualmente en preparación. Las Glioxil agarosas fueron gentilmente donadas por el grupo del Prof. Dr. José Manuel Guisán y se contó con la ayuda procedimental del Dr. Cesar Mateo. Los soportes utilizados son: glioxil agarosa tradicional funcionalizada con grupos aldehído y agarosas modificadas con superficies catiónicas (mediante amonio cuaternario), aniónicas (ácido iminodiacético, IDA) y con metal quelatado (IDA-Ni²⁺).

3.1.2. Plásmidos, cepas y enzimas

De las enzimas comerciales se utilizó la enzima comercial Biolacta No 5[®] (β -galactosidasa de *Bacillus circulans* ATCC 31382)⁵⁵ la cual fue gentilmente aportada por la casa Daiwa Kasei (Osaka, Japón). Las lipasas de *C. Antarctica* y *C. Antarctica* B (recombinante en *A. oryzae*) fueron compradas a Sigma-Aldrich (códigos 62288 y 65986 respectivamente). La lipasa de *Rhizopus oryzae* (ROL) recombinante en *Pichia pastoris* fue donada por el grupo de investigación del Prof. Dr. Paco Valero, Departamento de Ingeniería Química, Universidad Autónoma de Barcelona, España.

Los procedimientos relativos a la inducción y cultivo de microorganismos termófilos, así como el clonaje y expresión de enzimas recombinantes de *T. thermophilus* se realizaron en el laboratorio del Prof. Dr. José Berenguer con la ayuda del Dr. Eloy Ferreras, del Centro de Biología Molecular Severo Ochoa (CBMSO) ubicado en la Universidad Autónoma de Madrid (UAM) y el Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC). Las cepas, plásmidos, genes y enzimas de organismos termófilos utilizadas, se describen a continuación.

La cepa de *Escherichia coli* DH5 α fue utilizada para amplificar y reproducir plásmidos. El vector pET28b(+) fue utilizado para expresar una cola con seis histidinas (his₆tag) y otros aminoácidos que actúan como grupo extensor (Ser-Ser-Gly-Leu-Val-Pro-Arg-Glu-Ser-His) ubicados en el grupo amino terminal de las proteínas recombinantes clonadas con este vector en la cepa de *E. coli* BL21. Las enzimas recombinantes TTP0042 his₆tag y TTP00222 his₆tag se expresaron en *E. coli* BL21.

Todos éstos vectores y cepas fueron comprados a Novagen (Reino Unido), mientras que el vector PMKE2 (análogo del plásmido PMKE1,²⁴⁶ ambos diseñados por el grupo de

investigación del Dr. José Berenguer) se utilizó para expresar proteínas recombinantes en una cepa facultativa de *Thermus thermophilus* HB27 para dar lugar al mutante HB27Nar, controlado por el promotor respiratorio de la nitrato reductasa y generando la misma cola de histidinas antes mencionada, la proteína expresada (TTP0042) se induce en condiciones anaeróbicas y en presencia de nitrato como aceptor de electrones.

Se utilizaron las cepas de *Thermus thermophilus* HB27 inducido con celobiosa¹³ y de la cepa mutante de *Thermus thermophilus* T42Kat cultivada con celobiosa (la cepa T42Kat de HB27 es una cepa mutante con la enzima TTP0042 atrofiada genéticamente por mutagénesis de inserto, la cual actúa como control negativo de la inducción por TTP0042), según metodologías detalladas más adelante.

Los genes mutantes de la enzima TTP0042: C167V y C167S en los que la cisteína 167 ha sido sustituida por una valina y una serina respectivamente, mediante técnicas de mutagénesis dirigida. Estos mutantes fueron diseñados por el doctorando Carlos Bayón del Grupo de Biotransformaciones en las instalaciones del CBMSO, en el laboratorio del Prof. Dr. Berenguer y con la colaboración del Dr. Aurelio Hidalgo.

3.1.3. Medios de cultivo

3.1.3.1. Medios de cultivo de *T. Thermophilus*.

Las cepas de *T. thermophilus* fueron cultivadas en el medio TH_{ff}, el cual está desarrollado para el crecimiento óptimo de ésta bacteria. Este medio se preparó con 8 g de triptona (digerido pancreático de caseína), 4 g de extracto de levadura, 3 g de cloruro de sodio, 1L de agua Fontjaraba ® y se ajusta el pH con hidróxido de sodio 2 M hasta 7,50. Este mismo medio al prepararse con agua milliQ se denomina como: medio TH.²⁴⁷

Los medios TH_{ff} para inducir actividad de tipo β -galactosidasa se diluyeron con agua milliQ hasta obtener una dilución final de ¼ y luego fueron enriquecidos con celobiosa (1g-2g por litro), la cual se adicionó por microfiltración en condiciones estériles, luego de preparar el medio de cultivo, generando un medio enriquecido con 0,1%-0,2% de celobiosa.

El mutante facultativo HB27Nar se cultivó a 70°C en medio TH con Kanamicina hasta una densidad óptica a 550 nm de 0,4. Luego, se añadió nitrato de potasio hasta alcanzar una concentración 40 mM y se dejó reposar por 12 h. La falta de agitación y la alta temperatura hacen el medio casi anaeróbico permitiendo la expresión del gen.

3.1.3.2. Medios de cultivo de *E. coli*

Las cepas de *E. coli* fueron cultivadas en el medio Luria-Bertani (LB): 10 g de triptona, 5g de extracto de levadura, 10 g de cloruro de sodio, 1 L de agua destilada y se ajusta el pH con hidróxido de sodio 2 M hasta 7,00.

3.1.3.3. Medio de cultivo SOC

Para cultivar cepas luego de transformaciones genéticas por electroporación (ver punto 3.2.2.) se utilizó el medio de cultivo SOC (un medio rico en nutrientes), preparado con 20g de triptona, 5 g de extracto de levadura, 0,5 g de cloruro de sodio, 1 L de agua destilada y se ajusta el pH con hidróxido de sodio 2 M hasta 7,00. Una vez autoclavado el medio se añaden por microfiltración y en condiciones de esterilidad 10 mL de glucosa 2 M y 10 mL de cloruro de magnesio 1 M.

3.1.4. Instrumentación general y métodos analíticos.

3.1.4.1. Cromatografía de capa fina (CCF)

Se realizó la CCF para determinación de azúcares utilizando como fase estacionaria cromatoplasmas de sílice 60 F₂₅₄ (Merck, Darmstadt, Germany), fase móvil: Isopropanol: nitrometano: agua 10:9:2 (v:v:v) y como revelador de azúcares: 5% de ácido sulfúrico en metanol y calentamiento moderado de la placa.

3.1.4.2. Cromatografía de afinidad Ni²⁺ - Agarosa

La cromatografía de afinidad de Ni²⁺- Agarosa para proteínas recombinantes con colas de histidina se realiza a temperatura ambiente en el dispositivo para purificación de proteínas (Biologic, BioRad) sobre una serie de columnas de afinidad (IMAC, del inglés “*immobilized*

metal afinito cromatography”) cargadas con iones de níquel (II), una fase móvil de diferentes tampones según protocolos consultados^{248, 249}, siendo éstos:

- Tampón de adhesión: 300 mM de NaCl, pH 8,00 de fosfato de sodio 50 mM y 1 mM de imidazol.
- Tampón de lavado de 300 mM de NaCl, pH 8,00 de fosfato de sodio 50 mM y 10 mM de imidazol.
- Tampón de elución 300 mM de NaCl, pH 8,00 de fosfato de sodio 50 mM y 500 mM de imidazol.

Las fracciones obtenidas fueron monitoreadas por absorbancia a 280 nm y conductividad eléctrica utilizando el dispositivo de purificación.

3.1.4.3. Cromatografía líquida de alta resolución

El seguimiento de las reacciones enzimáticas de transglicosidación se realizó mediante HPLC (cromatografía líquida de alta resolución), empleando para ello un cromatógrafo Jasco 2000 equipado con una columna NH₂P50-4E de grupos aminos (Asahipak, Japón) eluido a 0,8 mL/min, con una fase móvil de 80 % acetonitrilo y 20 % de agua. Se utilizaron detectores de luz ultravioleta (UV) y de dicroísmo circular (DC) fijados a 317 nm (por que a esa longitud de onda los grupo *p*-nitrofenil sin ionizar son más sensibles a ser detectados) y conectados en serie con un detector de dispersión de la luz por evaporación (“*evaporative light scattering detector*”, ELSD, temperatura del tubo de deriva [DT]: 60 °C y de la cámara de spray [SC]: 54 °C). Las mismas condiciones se utilizaron para analizar mezclas azúcares peracetilados en proceso de desacetilación asimétrica enzimática.

Para analizar azúcares sometidos a procesos de acilación con ésteres vinílicos se utilizó la columna ODS Hypersyl 120-5C18 (Thermoelectron corporation) de 250 mm x 4.6 mm con un tamaño de partícula de 5 µm eluida a 0.20 mL/min utilizando de fase móvil 75:20:5 (MeOH:ACN:H₂O). Se utilizó un sistema de dos detectores ELSD para detectar los compuestos sólidos en general y UV para detectar compuestos con el residuo de *p*-nitrofenil que absorbe a 317 nm.

3.1.4.4. Cromatografía en columnas de Carbón-Celite

La purificación de disacáridos obtenidos en reacciones enzimáticas de transglucosidación se realizó por medio de columnas compuestas por 50 % m/m de carbón activado y 50 % m/m de celite, en columnas de 2 x 50 cm, con una altura de columna de aproximadamente 20 cm. Las columnas se lavan como mínimo con 3 volúmenes de agua respecto al volumen de soporte, y se eluyen con un mínimo de 3 volúmenes equivalentes al de la columna, utilizando cada una de las siguientes fases móviles, en orden respectivo:

- 100 % agua milliQ,
- 5 % de etanol absoluto en agua milliQ
- 15 % de etanol absoluto en agua milliQ.

Los disacáridos se recogen en las fracciones de la última elución, correspondiente al 15% de etanol (analizadas inicialmente por CCF). Posteriormente se analiza la pureza por HPLC-ELSD y se determinó su estructura por espectroscopia de resonancia magnética nuclear.

3.1.4.5. Espectroscopia de Resonancia Magnética Nuclear

Los espectros de ^1H -RMN para compuestos purificados se realizaron con un Bruker AC-250 cuya frecuencia es 250 MHz, en presencia de D_2O , el experimento se realizó con presaturación del agua. En el caso de muestras muy diluidas o para espectros de ^{13}H -RMN de reacción se utilizó un RMN Bruker de 500 MHz ó 700 MHz.

3.1.4.6. Reacciones en serie

Las reacciones de síntesis de disacáridos se realizaron en un reactor en serie RR98072 de la marca Radleys, equipado con refrigeración por agua recirculante, agitación magnética controlada y control de temperatura. Con este sistema todas las reacciones conservan la misma agitación y temperatura.

3.1.4.7. Espectrofotometría ultravioleta-visible

Las medidas de absorbancia se realizaron en el espectrofotómetro: UV-2401 PC (Shimadzu) para los ensayos realizados en la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense de Madrid (UCM) y un espectrofotómetro Hitachi U-2000 para los ensayos realizados en el CBMSO.

3.1.4.8. Cultivos de microorganismos

Los cultivos de microorganismos en medio líquido se crecieron en un incubador Max 5000 (Barnsted Lab Line) para temperaturas de 37 °C, mientras que para temperaturas mayores a 60 °C se utilizó un agitador-incubador de ambiente controlado (New Brunswick, scientific Co.). Estas actividades se desarrollaron en el CBMSO.

3.1.4.9. Ruptura celular de microorganismos

La ruptura de células de los microorganismos utilizados se realizó en el CBMSO en un procesador ultrasónico (sonicador) modelo LABSONIC M de la casa Sartorius y en un sonicador Branson Sonifier 450 de la Facultad de Farmacia de la UCM. La ruptura se realizó en al menos cuatro ciclos de 2 minutos en tubos de vidrio (corex) o en su defecto de plástico (falcon) en todos los casos se realizó sobre un baño de hielo para evitar calentamientos. La intensidad de cada sonicación fue de aproximadamente 12000 microns (intensidad referida entre pico y pico).

Otro método de ruptura utilizado (CBMSO) fue la presión en una prensa francesa (French Pressure Press, American Instruments, Co.) en al menos dos ciclos de 20000 libras por pulgada cuadrada (psi) para pellets de bacterias resuspendidos en tampón con volúmenes finales de resuspensión entre 30 y 120 mL.

3.1.4.10. Centrifugación

La centrifugación de cultivos celulares con volúmenes mayores a 250 mL se realizó en ultracentrifugas Avanti J-25 (Beckman CoulterTM) en las instalaciones del CBMSO.

La centrifugación de proteínas precipitadas con sulfato de amonio se realizó en una centrífuga Sorvall (serie 7500320). Los extractos de proteínas de bajas concentraciones (≥ 2 mg/mL) que requerían ser concentrados, se sometieron a procesos de ultracentrifugación a 4°C y 4000 rpm por 15 minutos en tubos Amicon (Millipore, USA) con un poro de membrana de 30 kDa, luego de los 15 minutos, se separa el líquido filtrado y se repite el ciclo en caso de ser necesario. Este procedimiento se realizó en la UCM en la centrífuga CR312 de Jouan.

3.1.4.11. Diálisis y concentración de medios dializados

Las muestras que requerían ser limpiadas de sales y componentes de bajo peso molecular se dializaron en membranas de diálisis con un poro de 3500 Da (previamente lavadas por 30 minutos en agua destilada para eliminar la azida sódica), compradas a la casa comercial Spectra/Por®. También se utilizaron tubos amicon de ultracentrifugación con poros de 30 kDa (Millipore).

3.1.4.12. Liofilización

Los procesos de liofilización se efectuaron en un liofilizador: Labconco, Lyph-Lock 12, (Hucha-Erlóss).

3.1.4.13. Electroforesis de proteínas

La electroforesis se realizó con una fuente de poder 1000/500, y la cubeta mini protean tetraCel, de la casa comercial BioRad utilizando entre 175V y 190V.

3.2. PROCEDIMIENTOS GENERALES

3.2.1. Transformación de Bacterias

3.2.1.1. Extracción de ADN de plásmidos bacteriano

La manipulación de ADN para expresar proteínas recombinantes en distintos organismos, requiere de la extracción rápida y de alta pureza del ADN, sobretodo de plásmidos. Para este

proceso se siguió el protocolo ofrecido por el fabricante de minipreps (Plus mini preps DNA purification system, Wizard ®). El protocolo es el siguiente:

Se centrifuga a máxima velocidad 10 mL de cultivo de células producidas durante toda una noche. Se adicionan 250 µL de solución de resuspensión celular y se resuspenden las células que luego son transferidas a un tubo Eppendorf. Se adicionan 250 µL de disolución para lisis celular y se mezcla por inversión 4 veces. Se adicionan 10 µL de disolución de proteasa alcalina y se mezcla por inversión 4 veces. Se incuba a temperatura ambiente por 5 minutos. Se adicionan 350 µL de disolución de neutralización y se mezcla por inversión 4 veces. Se centrifuga a máxima velocidad por 10 minutos a temperatura ambiente. Se ensambla la columna de adsorción de ADN y se adiciona el líquido obtenido en los pasos 1 al 7. Se centrifuga a alta velocidad la mezcla por un minuto. Se desecha el líquido y se lava con 1 mL de disolución de lavado a la cual se le ha añadido también etanol. Se centrifuga de nuevo y se desecha el líquido obtenido. Se repite el paso 9 y el 10, pero con 250 mL de disolución de lavado con etanol añadido. Se centrifuga la columna por 2 minutos sin adicionar nada, para evitar restos de etanol en ella. Se adicionan 100 µL de agua libre de nucleasas a 70 °C y se centrifuga. El ADN se conserva a -20 °C.

3.2.1.2. Introducción de plásmidos en células competentes

Para introducir plásmidos y transformar genéticamente cepas de bacterias (normalmente *E. coli* DH5α, y *E. coli* BL21 y *T. thermophilus* HB27Nar), se utilizaron dos métodos: 1) transformación por choque térmico; 2) transformación por electroporación.

Transformación por choque térmico

En condiciones de esterilidad (con llama) se coloca un Eppendorf dentro de un baño con hielo. En el Eppendorf se adicionan aproximadamente 50 µL de bacterias competentes (con una densidad óptica a 550 nm entre 0,6 y 1,0) y 500 ng de plásmido. Se deja la mezcla enfriar por media hora en reposo. Pasado este tiempo, se introduce rápidamente el tubo Eppendorf en un termobloque a 42 °C durante 1,5 minutos, luego se deja reposar nuevamente en un baño con hielo por 2 minutos más. Luego de la transformación, Las bacterias se cultivan en 500 µL de medio de cultivo a la temperatura del organismo y con antibiótico específico según el gen injertado para garantizar la permanencia del plásmido y

seleccionar aquellos organismos transformados, los cuales en su nuevo ADN poseen resistencia al antibiótico. El plásmido PET28b(+) y el PMKE2 codifican un gen con resistencia a la kanamicina y adicionan una cola de histidinas a la proteína que se exprese en con éstos vectores. Las temperaturas de crecimiento fueron: 37°C para células de *E. coli* y 70°C para células de *T. thermophilus*.

Transformación por electroporación

En condiciones de esterilidad (con llama) se coloca un tubo Eppendorf dentro de un baño con hielo. En el tubo se adicionan 50 µL de bacterias competentes (con una densidad óptica a 550 nm entre 0,6 y 1,0) y 500 ng de plásmido. Se colocan dos celdas de electroporación a -20°C (las celdas son estériles). Se agita la mezcla contenida en los tubos Eppendorf y se transfiere su contenido a la respectiva celda de electroporación previamente enfriada. Se electroporan las células con el ADN haciendo pasar 2500 V por 5 ms en un electroporador, se realiza un blanco sin ADN. Realizada la electroporación se adicionan 1,00 mL de medio de crecimiento SOC. Luego las bacterias se cultivan en 500 µL de medio de cultivo con glucosa al 0,5% m/v y su antibiótico específico según el gen injertado para garantizar la permanencia del plásmido y seleccionar aquellos organismos transformados, los cuales en su nuevo ADN poseen resistencia al antibiótico.

3.2.2. Técnicas de Electroforesis

3.2.2.1. Electroforesis de ADN en geles de agarosa

Para analizar el peso molecular de los plásmidos, fragmentos y ligaciones de ADN se utilizó la técnica de electroforesis en geles de agarosa. Para ello se miden 40 mL del tampón TAE 1X (Tris 40 mM, EDTA disódico 2 mM y ácido acético glacial 0,1142 % v/v), se les adiciona 0,32 gramos de agarosa (0,8 %) y se calienta hasta fundir la mezcla en una sola fase. Antes de que la disolución se enfríe totalmente y gelifique, se le adicionan 10 µL de bromuro de etidio 1 mg/mL. Se vierte la mezcla en la cámara ensamblada y se enfría hasta endurecer, se deben evitar todas las burbujas. Se adiciona disolución de TAE 1X hasta cubrir ligeramente el gel de agarosa. Se toman entre 5 y 15 µL de tampón de carga y se mezclan con 5 µL de muestra de ADN. Se coloca la muestra de ADN-Tampón de carga en los pocillos del gel. Se coloca una muestra de marcadores de ADN en uno de los pocillos. Se

coloca el campo eléctrico a 90 V y se deja correr la electroforesis. Se revelan los resultados con luz ultravioleta.

3.2.2.2. Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida

Para analizar la pureza de las proteínas y el peso molecular de las mismas, utilizó la técnica de electroforesis en geles de poliacrilamida basada en el método de Laemmli²⁵⁰. Se usaron geles de separación de 12,5 % de acrilamida preparados con 1,25 de bis:acrilamida (29:1 al 40%) respectivamente, 1 mL de tampón Tris-HCl pH 8,80 1,50 M, 1,69 de agua destilada, 40 µL de SDS al 10%, 10 µL de Temed y 30 µL de PSA. Para los geles de acrilamida de 7,5% se utilizó 0,75 mL de bis:acrilamida y 2,19 mL de agua destilada, las demás concentraciones de reactivos fueron iguales a las descritas anteriormente. El gel concentrador (“*stacking gel*”) utilizado fue al 3% de acrilamida. Se preparó utilizando 150 µL de bisacrilamida (29:1 al 40 %), 1 mL de tampón Tris-HCl pH 6,80 0,50 M, 822 µL de agua destilada 18 µL de SDS al 10 %, 5 µL de Temed y 15 µL de PSA.

Las muestras con proteínas se mezclaron en proporción 1:1 (v:v) con tampón de carga, que se preparó con 773 µL de SDS al 10 %, 613 µL de Tamón Tris-HCl 0,50 M pH 6,80, 233 µL de β-mercaptoetanol, 400 µL de glicerol y 0,8 mg de azul de bromofenol. Una vez mezcladas con el tampón de carga, se calentaron a 96°C por 10 minutos y se centrifugaron 3 minutos, el líquido remanente se cargó en los geles y se corrieron a 175V en tampón de electroforesis (30,3 g SDS, 144 g tris, 10 g de glicina, 1L de agua destilada). El revelado de los geles se alcanzó con una disolución del tinte comercial Page Blue 83 al 0,1% (metanol: agua: ácido acético, 5:4:1) y se destiñó con la misma mezcla sin Page Blue 83. La electroforesis en condiciones no desnaturizantes se realizó en ausencia de SDS, β-mercaptoetanol (tampón de muestra), sustancias que se sustituyeron por agua destilada en todas las preparaciones para mantener las mismas concentraciones de tampones y geles. Así mismo se omitió el calentamiento de la muestra a 96 °C para este tipo de electroforesis.

3.2.3. Cuantificación de Proteínas

Se determinó la cantidad de proteína en disoluciones según el método de Bradford²⁵¹ que se basa en la variación en el espectro de absorción visible del colorante azul brillante de

Coomasie G-250 en presencia de una proteína. La adsorción de proteína provoca que la absorbancia máxima del colorante se desplace de 465 a 595 nm.

Tabla 5. Disoluciones sucesivas de proteína patrón para realizar la recta de calibrado en la determinación de proteínas por el método de Bradford ²⁵¹.

Tubo		Reactivos		
Nº	µL de Proteína (0,75 mg/mL)	µL de Agua MilliQ	mL de Bradford (dilución 1:5)	BSA (µg/mL)
0 *	0	100	5,00	0
1	20	80	5,00	2,94
2	30	70	5,00	4,41
3	40	60	5,00	5,88
4	50	50	5,00	7,35
5	60	40	5,00	8,82
6	70	30	5,00	10,29
7	80	20	5,00	11,76
8	90	10	5,00	13,23
9	100	0	5,00	14,71

* El valor de cero se midió para establecer el blanco de trabajo en la recta de calibrado, pero este valor NO se graficó puesto que no está ubicado en el rango lineal de éste método.

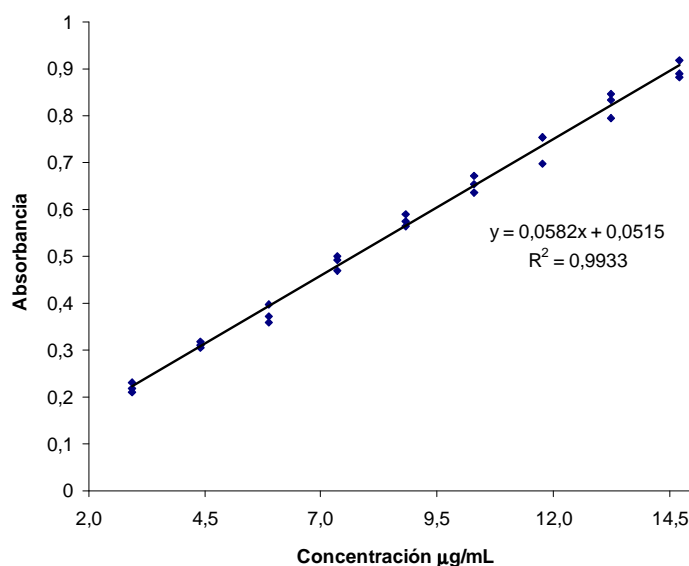


Figura 13. Modelo de una recta de calibrado para la cuantificación de proteínas en disolución utilizando el método de Bradford ²⁵¹. El rango lineal de éste método según instrucciones del fabricante va desde 3,9 $\mu\text{g/mL}$ hasta 17,6 $\mu\text{g/mL}$ (referidos al volumen final de 5,10 mL) por este motivo no se extrapola la recta al origen de los ejes del gráfico.

La preparación del reactivo de Bradford se llevó a cabo partiendo de un concentrado comercial de Bio-Rad (Dye reagent) siguiendo las instrucciones del fabricante (dilución 1:5 para el método estándar y sin dilución para el método micro). Como patrón de proteína se utilizó una solución de albúmina de suero bovina (BSA) de concentración 0,75 mg/mL en agua milli Q o en el tampón de muestra, según fuera el caso.

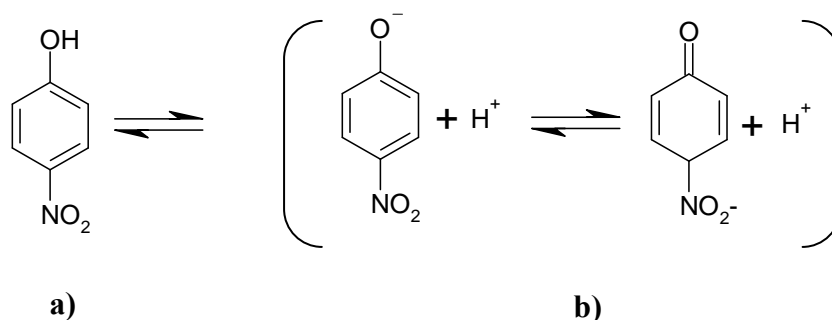
Se realizaron disoluciones sucesivas de la proteína patrón como se muestra en la tabla 3, completándose con agua milliQ (o tampón) hasta un volumen total de 0,1 mL. A continuación se añadieron 5,00 mL de reactivo de Bradford y se homogenizó la mezcla. La adsorción de la proteína al colorante se produce instantáneamente siendo máxima y estable entre los 5 y 20 primeros minutos. Todos los ensayos se realizaron a temperatura ambiente y por triplicado según la tabla de dilución utilizada (tabla 5). Estos datos dan lugar a la recta de calibrado presentada en la figura 13. Los resultados de absorbancia en función de la concentración de proteína, en $\mu\text{g/ml}$ para el volumen final de 5,10 mL, se ajustaron por regresión lineal al modelo de una recta de primer grado, cuya linealidad se valoró según el valor de R^2 (figura 13).

3.2.4. Determinación de actividad enzimática

La actividad de tipo glicosidasa en especial β -galactosidasa se realizó por hidrólisis de *p*-nitrofenil glicósidos, los cuales liberan una cantidad de *p*-nitrofenol directamente proporcional a la cantidad de enlaces glicosídicos hidrolizados. La actividad enzimática se determinó a diferentes valores de pH según los requerimientos de la enzima y por absorbancia a 410 nm del *p*-nitrofenol hidrolizado. Se define una unidad enzimática (U) como la cantidad de enzima que libera un micromol de *p*NF por minuto en las condiciones de un determinado ensayo. Para enzimas inmovilizadas se calculó la actividad en U/gramo de soporte y U/mg enzima inmovilizada.

3.2.4.1. Cuantificación de *p*-nitrofenol (*p*NF)

El *p*-nitrofenol (*p*NF) es un compuesto que en disolución acuosa posee equilibrio de disociación ácida, el cual varía entre la forma protonada (fenol) y la forma aniónica, estabilizada por un equilibrio entre el ión fenóxido y la quinona resultante (esquema 15).²⁵²



Esquema 15. Estructura del *p*-nitrofenol en su forma **a)** protonada; **b)** ionizada.

La forma ionizada mantiene un equilibrio entre el ión de tipo fenóxido y la quinona con carga negativa en el grupo nitro, esta forma es de color amarillo y absorbe a 410 nm. Esta sustancia posee una pKa cercana a 7.20, lo que teóricamente supone que debajo de éste valor de pH más del 50 % de las moléculas de *p*NF estarán en forma protonada, y por encima de éste valor, más del 50 % de las moléculas del *p*NF estarán en forma ionizada. Es por ello, que en función del pH predominará una u otra forma de ésta sustancia y por ende su absorbancia a 410 nm variará en función del pH. Otros dos factores que influyen en la cuantificación del *p*NF son la temperatura, pues existe un leve desplazamiento termosolvatocrómico desplazado hacia el rojo y un aumento del volumen de la muestra por temperatura causando una reducción de la concentración de *p*NF a mayores temperaturas.²⁵³ Finalmente, cabe mencionar que una de las opciones que existen para facilitar el análisis de *p*NF es adicionar carbonato de sodio al medio en disolución para desplazar totalmente el equilibrio hacia la forma aniónica. Este principio se ha utilizado en numerosas publicaciones en las que se utilizan sustratos que luego de ser hidrolizados enzimáticamente liberan *p*NF^{100, 116, 118, 120}. El uso de carbonato de sodio permite ionizar en su totalidad las moléculas de *p*NF y por lo tanto cuantificarlas de una forma precisa.

Procedimiento para recta de calibrado de *p*NF

Partiendo de *p*NF (139,11g/mol) calidad HPLC se pesan 25,0 mg de sólido y se disuelven en un matraz aforado de 100,0 mL con agua destilada. De este primer patrón (1,98 mM) en agua destilada se toman 1,60 mL del mismo y se le adicionan 3,48 mL del tampón de interés para ajustar el pH en las mismas condiciones de la matriz de trabajo.

Tabla 6. Disoluciones sucesivas de un patrón de *p*NF (566 μ M) para realizar la recta de calibrado a 410 nm.

No	Volumen añadido de <i>p</i> NF (566 μ M)	Concentración <i>p</i> NF (μ M)
0	0	0,00
1	20	4,49
2	40	8,91
3	60	13,27
4	80	17,55
5	100	21,77
6	120	25,92
7	140	30,02
8	160	34,05
9	180	38,01
10	200	41,93
11	220	45,78
12	240	49,58
13	260	53,32
14	280	57,01
15	300	60,64

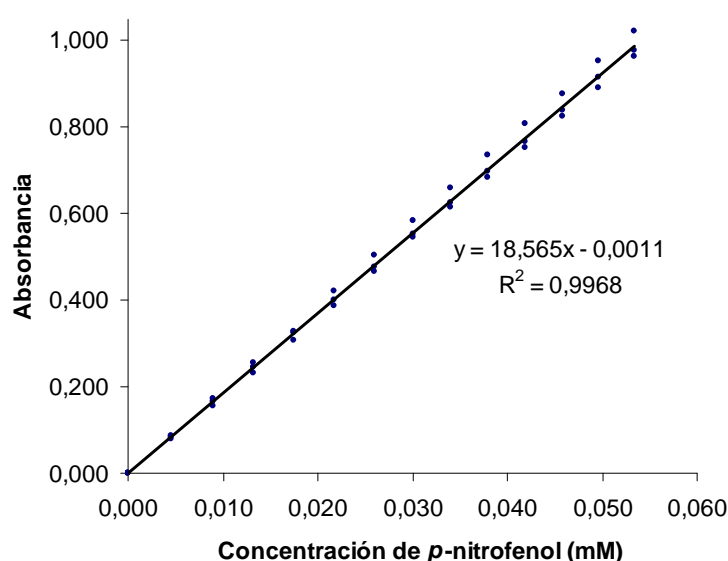


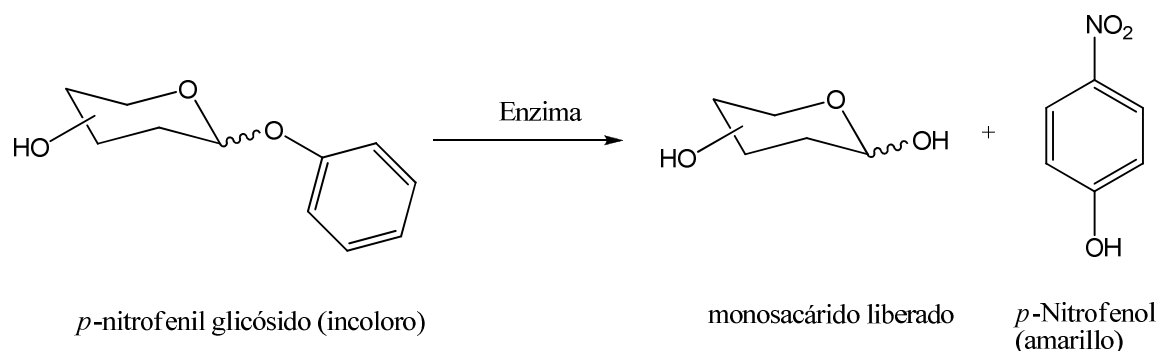
Figura 14. Recta de calibrado (por triplicado) obtenida experimentalmente a 410 nm y 25°C para *p*NF disuelto en carbonato de sodio 0,20 M.

De éste segundo patrón (566 μ M) se toman alícuotas de 20 μ L cada una (ver tabla 6) y se añaden a una cubeta de cuarzo que contiene 2,50 mL de carbonato de sodio 0,20M)o tampón del pH al cual se desea realizar el calibrado) y se lee la absorbancia a 410 nm. Con los datos obtenidos de la tabla 4 se elabora un gráfico de absorbancia leída a 410 nm en función de la concentración milimolar de *p*NF (Figura 14). Una ventaja de la recta de calibrado en condiciones alcalinas, es que el carbonato de sodio en exceso neutraliza todo el

tampón inicial de la muestra y que por lo tanto el *p*NF se encuentra completamente ionizado por el elevado pH del medio.

3.2.4.2. Actividad hidrolítica de tipo β -glicosidasa

Para determinar la actividad hidrolítica de una glicosidasa se utilizan azúcares unidos por enlaces glicosídicos a moléculas de *p*NF, que luego son liberadas en la hidrólisis y aumentan la coloración del medio. Este *p*NF puede cuantificarse espectrofotométricamente y con ello determinar la cantidad equivalente de azúcar hidrolizado (ver esquema 14). Finalmente la actividad enzimática específica se determina en función de los micromoles de *p*NF liberados por minuto y por un miligramo de proteína.



Esquema 16. Representación de la hidrólisis de *p*-nitrofenil glicósidos para su cuantificación enzimática.

Fourage y colaboradores,²⁵³ han explicado dos formas analíticas para cuantificar el *p*NF liberado en reacciones de hidrólisis enzimática donde se utilizan éstos glicósidos que liberan *p*NF. La primera forma es llamada el método continuo, y consiste en determinar el aumento de la absorbancia a 410 nm por liberación de *p*NF, este método requiere de sumos cuidados, ya que la temperatura y el pH deben ser tomados en cuenta para reproducir con exactitud la recta de calibrado. La segunda forma de determinar la actividad se le conoce como método discontinuo, y consiste en detener la reacción en un momento determinado (por lo general adicionando NaOH ó Na₂CO₃ concentrados), cuantificando el *p*NF liberado en las mismas condiciones de fin de la reacción. El uso de NaOH ó de Na₂CO₃ garantiza alcanzar valores de pH tan altos que el equilibrio de ionización del *p*NF está completamente desplazado hacia la forma disociada.²⁵³ Es importante mencionar que ambas metodologías (continua y discontinua) han sido utilizadas en varios estudios, resaltando entre éstos la clonación y

purificación de TTP0042⁷² y la purificación de las tres enzimas β -galactosidasas de *B. circulans* ATCC 31382,⁶² por lo que su validez ha sido comprobada.

Ensayo de actividad enzimática por liberación de pNF: método continuo

A menos que se indique lo contrario, todas las actividades enzimáticas referidas a la hidrólisis de *p*-nitrofenil glicósidos están referidas a este método en las condiciones que se describen a continuación.

En una cubeta de cuarzo se colocan 2,0 mL de *p*NF- β -Gal (5 mM) disuelto en tampón fosfato de sodio 50 mM pH 7,00. La mezcla se atempera en el espectrofotómetro por un baño de agua circulante adaptado al sistema y se agita con un agitador magnético adaptado al espectrofotómetro. La temperatura de este ensayo es de 37°C para enzimas de *B. circulans* y 80°C para enzimas termófilas. Una vez que la cubeta se ha atemperado por al menos 90 segundos, se adicionan 10 μ L de enzima (normalmente con una concentración de 1 mg/mL, para que la cantidad total de proteína sea de 1 μ g). Al añadir la enzima se cuantifica el incremento de absorbancia a 410 nm y se miden los resultados contra una recta de calibrado de *p*NF realizada en las mismas condiciones experimentales: pH 7,00, tampón fosfato de sodio 50 mM.

Ensayo de actividad enzimática por liberación de pNF: método discontinuo

En un tubo Eppendorf se colocan 4 μ L de disolución *p*NF- β -Gal 50 mM, a este se le adiciona el tampón de reacción de en cantidad apropiada, para que la suma de volúmenes incluyendo la enzima (por lo general con un volumen no mayor a 10 μ L y de concentración exactamente conocida) alcance un total de 200 μ L. Se agita la mezcla en un vortex y se calienta a la temperatura adecuada del ensayo (por lo general 37 °C para ensayos con Biolacta No5 y temperaturas superiores a los 60°C para enzimas de origen termófilo). Pasados 10 minutos de reacción se detiene la reacción por adición de 1,00 mL de Na₂CO₃ 0,2 M y se refrigeran las muestras hasta su lectura en el espectrofotómetro. Se realiza un blanco de procedimiento, al cual no se le adiciona ninguna cantidad de enzima hasta luego de agregar el Na₂CO₃.

Las muestras hidrolizadas se diluyen utilizando una cantidad adicional de Na_2CO_3 0,2 M y se leen a 410 nm. El *p*NF liberado se calcula con base en una recta de calibrado preparada en las mismas condiciones de reacción y tomando en cuenta el blanco de procedimiento. Se define como una unidad enzimática la cantidad de enzima que puede liberar un micromol de *p*NF por minuto en un medio 1 mM de sustrato a la temperatura de referencia del ensayo.

3.2.5. Purificación de enzimas recombinantes con colas de histidina

Las enzimas recombinantes de HB27 expresadas en *E. coli* (TTP0222 his₆tag y TTP0042 his₆tag) y TTP0042 expresada en HB27Nar se obtuvieron por medio del siguiente procedimiento:

Se centrifugaron las bacterias inducidas a 6500 rpm por 10 minutos y 4 °C. El pellet obtenido se resuspendió con tampón fosfato de sodio 50 mM, pH 7,50. Las células fueron resuspendidas en volúmenes de 25 mL por cada 500 mL de cultivo bacteriano centrifugado, se rompieron al hacerse pasar dos veces por una prensa francesa a 20000 psi o luego de sonicarse en las condiciones antes descritas. Los extractos obtenidos se centrifugaron a 15000 rpm por 30 minutos a 4 °C. Se eliminó el sólido generado y se calentó el líquido por 30 minutos a 70 °C para eliminar por precipitación térmica proteínas de *E. coli* remanentes. Este paso se omitió con los extractos celulares de HB27Nar debido a que el organismo de clonación es termófilo y por ello las proteínas del mismo no precipitarían.

Luego del calentamiento se eliminó el precipitado por centrifugación durante 30 minutos a 4 °C y 15000 rpm. El líquido generado, conocido como “extracto clarificado” se hizo pasar por columnas cargadas de níquel (II) en un aparato de purificación de proteínas “Biologic” (BioRad) siguiendo el protocolo dado por el fabricante, del cual se hace una breve mención.

Se eluyeron como máximo, el equivalente a 500 mL de cultivo bacteriano en forma de extracto clarificado sobre 3 columnas de 1 mL. La elución da inicio luego de lavar con agua destilada las columnas (previamente guardadas en etanol), el volumen de agua o de cada eluyente, es por norma mínima, 5 veces el volumen del sistema de columnas empleado, así por ejemplo, con tres columnas de 1 mL se utilizan volúmenes de 15 mL de cada eluyente.

La velocidad de lavado en todos los pasos es de 2 mL/min excepto para la adhesión que es de 0,5 mL/min.

Posteriormente la columna se equilibra con tampón de adhesión (*binding buffer*, ver punto 3.1.4.2.), la muestra se carga a pH 8.0 (diluyendo 50 % v/v de muestra y 50 % v/v de tampón de adhesión 2X,) y se adhiere lentamente a un flujo de 0,5 mL/min. Una vez adheridas las proteínas a las columnas, se realiza el lavado con tampón de lavado, que ha sido ligeramente enriquecido con imidazol (10 mM) para eliminar proteínas que pudieran tener cierta afinidad por el níquel debido a múltiples histidinas. Finalmente la mezcla se eluye con tampón de lavado, el cual posee 500 mM de imidazol y por ello desprende las proteínas adheridas a las columnas.

El aparato está dotado con lector de ultravioleta a 280 nm y con sensor de conductividad eléctrica, con ello se puede monitorear los valores de salinidad de cada tampón y estimar el equilibrio de la columna. Además se pueden observar las concentraciones relativas de proteínas a 280 nm. Se recogen aquellas fracciones correspondientes a la proteína recombinante con colas de histidinas, que eluyen con el tampón de lavado, las fracciones se desalinizan y se concentran con un tubo de ultra centrifugación Amicon® (Millipore) a 4000 rpm por 10 minutos a 4 °C, repitiendo la desalinización tres veces con el tampón en que se desea la enzima, en este caso, fosfato de sodio 50 mM pH 6,0. Se determinó la actividad relativa de cada proteína purificada y se analizó su pureza por electroforesis en presencia de SDS.

3.2.6. Seguimiento de las reacciones por HPLC

Las alícuotas obtenidas en los distintos intervalos muestreados de las reacciones se diluyeron (de 10 a 20 veces) y se filtraron para ser analizadas por HPLC-ELSD. De los datos obtenidos en el cromatograma se estimaron las proporciones de disacáridos mediante las siguientes metodologías:

a) Método directo o de normalización de áreas: Los productos obtenidos se identificaron en los cromatogramas contra patrones de azúcares inyectados diariamente (*p*NF-β-Gal, GlcNAc, Gal, Gal β[1→4] GlcNAc y Gal β[1→6] GlcNAc) y se estimó la proporción de cada sustancia por su porcentaje de área en el cromatograma.

b) Método de la calibración absoluta o del estándar externo: Se utilizó un estándar externo de disacáridos comerciales (Gal- β [1 \rightarrow 4]-GlcNAc y Gal- β [1 \rightarrow 6]-GlcNAc) cuya concentración fue conocida con precisión. Se preparó una recta de calibrado del área del compuesto en función de la concentración. Se utilizaron dichos azúcares dado que son dos de los productos que sintetizan las β -galactosidasas de *T. thermophilus* y de *B. circulans*. Los datos (Figura 15), se ajustaron a un modelo polinómico de primer grado y se evaluaron por su valor de R^2 .

Finalmente es importante mencionar que el detector UV se utilizó para estimar en el cromatograma la distribución de los grupos *p*-nitrofenil liberados y/o condensados durante la reacción, ya que éstos (sin ionizar) absorben normalmente a 317 nm. Los glicoconjugados que incluyeron éstos compuestos aromáticos se detectaron también por DC (317 nm), ya que la presencia de dobles enlaces del sistema aromático cerca de un centro quiral como es el carbono anomérico permiten ser detectados con ésta técnica.

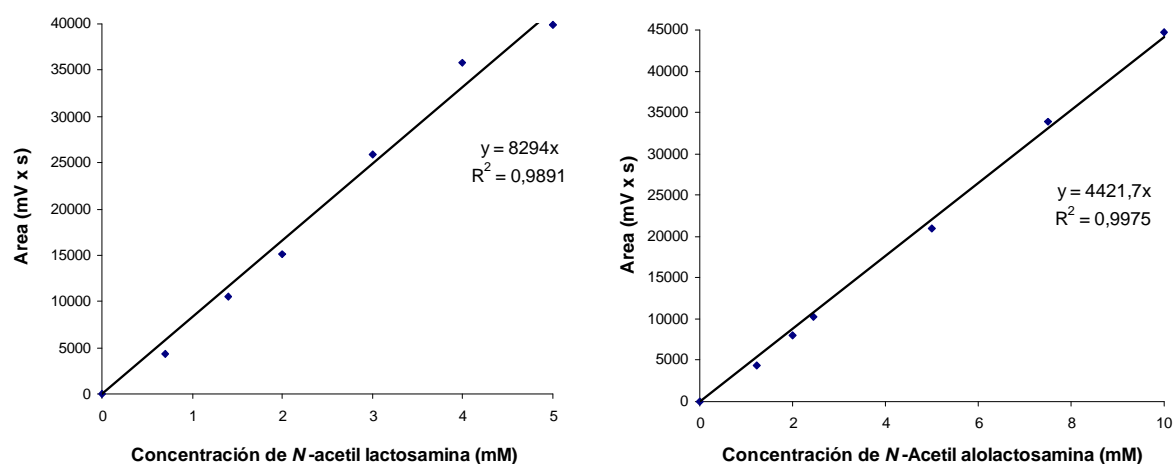


Figura 15. Rectas de calibrado de las áreas obtenidas mediante la técnica HPLC-ELSD para los compuestos: a) *N*-acetil lactosamina (Gal- β [1 \rightarrow 4]-GlcNAc) y b) *N*-acetil alolactosamina (Gal- β [1 \rightarrow 6]-GlcNAc) en función de su concentración (mM). En todos los casos se inyectaron 20 μ L de muestra.

3.3. SÍNTESIS DE OLIGOSACÁRIDOS CON β -GALACTOSIDASAS DE BIOLACTA

3.3.1. Caracterización y Purificaciones de la enzima comercial

La enzima comercial Biolacta N° 5 de la casa Daiwa Kasei (Osaka, Japón) se utilizó, para la síntesis de oligosacáridos, en tres tipos de preparado enzimático: 1- como extracto crudo, 2- como extracto proteico (libre de impurezas no proteicas) y 3- como enzima semipurificada, de la forma en que se detalla a en los siguientes puntos. Todas estas preparaciones fueron analizadas respecto a su actividad enzimática específica, su contenido de proteínas y sus perfiles de elución para electroforesis en geles de acrilamida (7,5 %) en condiciones desnaturalizantes y no desnaturalizantes.

3.3.1.1. Preparado comercial

La enzima comercial Biolacta es un preparado de composición y fabricación hasta cierto punto desconocido. Las referencias⁵⁵ en torno a esta mezcla enzimática indican que se obtiene de la cepa ATCC 31382 de *Bacillus circulans*. Este preparado comercial se utilizó sin tratamientos posteriores de purificación como biocatalizador. Esta preparación se ha denominado como F_0 .

3.3.1.2. Extractos proteicos

El extracto crudo de Biolacta posee un importante nivel de impurezas no proteicas cuya naturaleza es desconocida. Por ello, para obtener un extracto enriquecido en proteínas y libre de tales impurezas se sometió este preparado a una precipitación con sulfato de amonio mediante el procedimiento que a continuación se detalla.

Todas las operaciones se llevaron a cabo de 0°C a 4 ° C. Se disolvieron 5,0 gramos de la enzima comercial en 100,0 mL de tampón citrato/fosfato de sodio 50 mM pH 5,00. Se realizó una primera precipitación (basada en el primer reporte de purificación de ésta enzima⁶¹) adicionando 38,9 gramos de ésta sal a la disolución acuosa para obtener un 55% de saturación con sulfato de amonio y generar un primer precipitado F_{M1} , este precipitado se separó por centrifugación a 10000 rpm durante 20 minutos y 2 °C, luego se resuspendió

en tampón citrato / fosfato de sodio 50 mM pH 5,00 y finalmente se dializó (membrana con 8 kDa de poro) en un medio con tampón citrato / fosfato de sodio 10 mM pH 5,00 durante 36 horas y con tres cambios de tampón.

Con el fin de analizar las proteínas remanentes en disolución resultante luego de eliminar el sólido F_{M1} , se adicionaron 14,1 gramos más de sulfato de amonio a ésta mezcla, para obtener una segunda precipitación al 75% de saturación, con esto se pretendió superar los límites de la precipitación reportados en la última purificación publicada para este preparado enzimático⁶² y con ello se obtuvo un segundo precipitado: F_{M2} . El sólido se separó por centrifugación y se purificó de la misma forma que el precipitado F_{M1} .

3.3.1.3. Extracto proteico liofilizado

La preparación F_{M1} se congeló y se liofilizó dando lugar a un sólido blanco etiquetado como F_{L1} . Esta fracción se comparó en cuanto contenido de proteínas en sólido con respecto al preparado crudo de Biolacta, se compararon las actividades enzimáticas específicas de éstas y se realizó un gel de electroforesis para analizar posibles cambios en los perfiles de elución.

3.3.1.4. Enzima semipurificada

Una fracción semipurificada de Biolacta N° 5 fue facilitada por Sara Gómez Quevedo quien la preparo como parte de su tesis doctoral. Esta fracción se preparó entre 0 °C y 4 °C, de acuerdo al siguiente procedimiento. Se disolvieron 5,0 gramos de la enzima comercial en 100 mL de tampón citrato/ fosfato de sodio 50 mM pH 5,00 y luego se añadieron 17 mL de 2-mercaptoetanol y 17,8 mg de ácido etilendiamino tetraacético (EDTA) a la disolución.

Pasado este proceso se precipitó la mezcla con 70 % de saturación de sulfato de amonio (añadiendo 49,5 gramos de dicha sal), el precipitado se centrifugó a 10000 rpm durante 20 minutos y se resuspendió en el menor volumen posible de tampón citrato/fosfato de sodio 50 mM pH 5,00 y luego se dializó (8 kDa de la membrana de poro) contra el mismo tampón. La disolución de proteínas dializada se cargó en una columna de Sephadex G-150 equilibrada en tampón fosfato 100 mM pH 6,50, las fracciones se monitorearon a 280 nm y se probó la actividad β -galactosidasa con p NF- β -Gal. Se obtuvieron dos series

enzimáticamente activas denominadas como F_{S1} y F_{S2} cuyas fracciones se agruparon entre sí y se precipitaron nuevamente con un 70% de saturación de sulfato de amonio como se describió anteriormente y se resuspendió en tampón citrato/fosfato de sodio 50 mM pH 5,00.

3.3.2. Síntesis de disacáridos con las enzimas de Biolacta en medio acuoso

3.3.2.1. Condiciones generales de transglicosilación

Las reacciones de transglicosidación con la enzima comercial Biolacta N° 5 y sus preparaciones derivadas se realizaron siguiendo metodologías previamente utilizadas para esta enzima.^{13, 254} Las reacciones se efectuaron a 30°C con 188 mg de GlcNAc (0,85M), 51,2 mg de *p*NF- β -Gal (0,17M) disueltos en un volumen final de 1,0 mL con tampón citrato/fosfato de sodio 50 mM y pH 5,00. La reacción se inició agregando 155 unidades enzimáticas de Biolacta (51,7 mg de sólido comercial). De cada reacción se tomaron alícuotas de 50 μ L cada 30 minutos hasta finalizar la reacción a las 3 horas. Cada alícuota se calentó por 10 minutos en un baño de polietilenglicol a 100°C para desnaturalizar la enzima y finalizar la reacción. Los remanentes finales de la reacción se unificaron para purificar los disacáridos obtenidos por cromatografía en columnas de carbón-celite y analizar los compuestos obtenidos por RMN (700 MHz, D₂O). Los espectros de los disacáridos obtenidos fueron concordantes con la literatura consultada:²⁵⁵

***N*-Acetil Alolactosamina** [Gal-(β 1 \rightarrow 6)-GlcNAc]: ¹H-NMR (700 MHz, D₂O): 1.94 (s, 3H, Ac), 4.33 (d, 1H, H1', J 1',2' = 7,91Hz), 4.61 (d, 0.56H, H1b, J 1 β , 2 = 8,47Hz) 5.09 (d, 0.66H, H1 α , J 1 α , 2 = 3.58 Hz). ¹³C-NMR: 21.81 (Me de Ac, α), 22.08 (Me de Ac, β), 53.95 (C-2 α), 56.52 (C-2 β), 60.94 (C-6'), 68.49 (C-4'), 68.57 (C-6 β), 68.59 (C-6 α), 69.62 (C-3 α), 69.77 (C-5 α), 70.52 (C-4 β), 70.56 (C-4 α), 70.56 (C-2'), 72.58 (C-3 β), 72.61 (C-3'), 74,85 (C-5 β), 75.11 (C-5'), 90.81 (C-1 α), 94.93 (C-1 β), 103.26 (C-1' β), 103.27 (C-1' α), 174.45 (C=O de Ac α), 174.70 (C=O de Ac β).

***N*-Acetil lactosamina** [Gal-(β 1 \rightarrow 4)-GlcNAc]:¹H-NMR (700 MHz, D₂O): 1.93 (s, 3H, Ac), 4.37 (d, 1H, H1', J 1', 2' = 7,84 Hz), 4.62 (d, 0.37H, H1 β , J 1 β , 2 = 8.06 Hz) 5.10 (d, 0.57H, H1 α , J 1 α , 2 = 2.24 Hz). ¹³C-NMR: 21,80 (Me de Ac, α), 22.10 (Me de Ac, β),

53.65 (C-2 α), 56.13 (C-2 β), 59.86 (C-6 α), 59.99 (C-6 β), 60.96 (C-6'), 68.48 (C-4'), 69.21 (C-3 α), 70.20 (C-5 α), 70.90 (C-2'), 72.43 (C-3 β , C-3'), 74.79 (C-5 β), 75.29 (C-5'), 78.24 (C-4 β), 78.68 (C-4 α), 90.46 (C-1 α), 94.80 (C-1 β), 102.80 (C-1' β), 102.86 (C-1' α), 174.40 (C=O de Ac α), 174.66 (C=O de Ac β).

3.3.2.2 Reacciones de transglicosidación en medio acuoso tamponado.

Se realizaron reacciones de transglicosidación con el preparado comercial (F₀), los extractos proteicos liofilizados (F_{L1}) y las fracciones semipurificadas (F_{S1} y F_{S2}) en las condiciones descritas en el punto 3.3.2.

3.3.3. Reacciones de transglicosidación en presencia de disolventes verdes.

La fracción de extractos proteicos liofilizados de Biolacta N° 5 (F_{L1}) se utilizó para efectuar reacciones de transglicosidación en presencia de disolventes procedentes derivados del glicerol y de la biomasa. Para ello se seleccionaron los disolventes que de acuerdo a la tesis doctoral de la Dra. María Pérez,¹³ y al trabajo realizado en colaboración con ella,^{256, 257} funcionaron como disolventes capaces de alterar la regioselectividad tradicional de las reacciones. Dichos cambios en la regioselectividad generan como producto principal Gal- β [1 \rightarrow 6]-GlcNAc en lugar del isómero Gal- β [1 \rightarrow 4]-GlcNAc. Los disolventes empleados se pueden dividir en tres tipos diferentes: 1- derivados cíclicos del glicerol 2- derivados del glicerol (de cadena abierta) 3- Derivados de la *N,N*-dimetil amida. La estructura de los disolvente aparece en el esquema 18 y su caracterización y reactividad aparece en las tablas 19 y 20. Los disolventes usados (por sus siglas), son los siguientes: G1, G2, G3, GC4, GC5, GC6, GC7, GC8, GC9, GC10, GC11 y GC12. De cada disolvente se colocó la masa necesaria para generar un medio 2M en 1,0 mL de volumen. Las condiciones de reacción fueron las mismas del punto 3.3.2 con la diferencia de que la concentración final de cada disolvente fuese 2,00 M en el medio de reacción.

3.3.3.1. Reacciones de transglicosidación con enzima semipurificada en presencia de disolventes verdes.

Las fracciones semipurificadas de Biolacta N° 5 (F_{S1} y F_{S2}) se utilizaron para catalizar reacciones de transglicosidación en presencia de los mejores disolventes, siguiendo las

mimas condiciones de reacción empleadas en el punto 3.3.2. En este paso, los disolventes seleccionados fueron: DMA1, G1, GC7, GC8 y GC11.

3.3.4. Reacciones de transglicosidación en presencia de líquidos iónicos.

Utilizando el preparado comercial de Biolacta N° 5 se llevaron a cabo reacciones de transglicosidación en las condiciones descritas en el punto 3.3.2. en presencia de un 30% (v/v) de líquido iónico y con 75 unidades enzimáticas (25 mg de sólido comercial), se seleccionó esta concentración de líquido iónico dado que la literatura consultada¹²⁶ describe mayores rendimientos y estabilidad para las enzimas de Biolacta en concentraciones similares de líquidos iónicos. Los líquidos iónicos empleados para este experimento fueron los siguientes: [Bmim][PF₆], [Omim][PF₆], [CPMA][MeSO₄], [Toma][Ntf₂].

3.3.5. Análisis proteómico de enzimas de Biolacta

Se contrató a la Unidad de Proteómica de la Universidad Complutense de Madrid, los servicios de huella peptídica y de peso molecular para bandas de proteínas específicamente seleccionadas (con base en los resultados de transglicosidación) de los geles de electroforesis (SDS-PAGE).

Del SDS-PAGE, utilizando la fracción de Biolacta precipitada con 55% de saturación con sulfato de amonio sin liofilizar (F_{M1}) se seleccionó una primera banda de proteínas ubicada entre los marcadores de 100 kDa y 75 kDa, aduciendo que dicha banda representaría la tercera isoenzima identificada en Biolacta N° 5 por parte de Vetere y Paoletti⁶², además de ser una de las pocas bandas presentes en el extracto semipurificado (F_{S2}) el cual presentó importante actividad sintética.

Del gel realizado en condiciones no desnaturalizantes se obtuvo en general solo tres bandas de proteínas para casi todas las fracciones analizadas. Por ello, se decidió seleccionar las tres bandas obtenidas con la fracción semipurificada de mayor actividad sintética (F_{S2}) y realizar el análisis proteómico de las mismas.

3.3.6. Estudios de modelado molecular y docking

Dados los resultados obtenidos con las fracciones de Biolacta (F_{L1}) y los disolventes verdes en donde se produjo un inusual cambio de regioselectividad de la enzima, se decidió realizar un modelado molecular tomando como base los resultados de homología obtenidos mediante el análisis proteómico de las enzimas. El modelado estudió las posibles interacciones entre los sustratos y el diolventes, así como la enzima y el disolvente. Este trabajo lo realizó Alvaro Cortes, doctorando de la Unidad de Bioinformática del CBMSO, CSIC, Madrid.

3.3.6.1. Modelado por homología:

De acuerdo con los resultados obtenidos con la la huella peptídica, se decidió seleccionar la β -galactosidasa de *Streptococcus pneumoniae*, como punto de partida para los estudios de modelado molecular, dada su alta homología con las proteínas contenidas en Biolacta. El modelo 3D del dominio con actividad catalítica de la β -galactosidasa (residuos 150-979) fue construido por homología de modelado basado en estructuras cristalinas disponibles de proteínas homólogas. La secuencia completa de aminoácidos de la proteína diana fue obtenida de la base de datos del NCBI (número de acceso gi | 148 992 245) en formato FASTA. La herramienta BLAST, del NCBI fue usada para determinar similitudes en la secuencia estructuras cristalinas de homología más próxima en Brookhaven Data Bank (PDB). Los resultados revelaron que la β -galactosidasa de *Bacteroides vulgatus* (AP ID: 3GM8), con una resolución de 2,4 Å constituye una plantilla adecuada (81% de homología en la zona seleccionada y un valor E de -104-2e).

Las secuencias de β -galactosidasas from *B. vulgatus*, *B. fragilis*, *B. thetaiotaomicron* y *E. coli*, fueron las de mayor similitud con la de *S. pneumoniae*, fueron utilizados para una alineación por parejas empleando la herramienta MUSCLE (del inglés “*Multiple Sequence Comparison by Log-Expectation*”).¹⁶⁵ La homología de modelado de la diana se realizó mediante dos servidores automatizados de homología de modelado: SWISS-MODEL²⁵⁶ y 3D-JIGSAW50²⁵⁷ utilizando como plantilla la proteína 3GM8. Se encontró que la primera fue el mejor modelo, y se seleccionó después para realizar 1000 pasos de máxima pendiente

de minimización de la energía utilizando la fuerza de campo del paquete GROMOS 96 y GROMACS 4.0.3,¹⁷⁶ para regularizar la geometría de la estructura de la proteína.

La calidad del modelo se analizó con el programa para calcular la torsión de los ángulos de la cadena principal: PROCHECK²⁵⁸ (gráfico de Ramachandran) y se verificó mediante la línea software de ERRAT²⁵⁹ y VERIFY_3D54 en el servidor de análisis estructural y comprobación de UCLA-DOE (<http://www.doembi.ucla.edu/Servicios/SV/>). La mayoría de los parámetros analizados tuvieron valores estadísticos que estaban en el intervalo de lo esperados para una proteína natural doblada y, por tanto, el modelo fue considerado validado.

3.3.6.2. Búsqueda del centro activo

La ausencia de una estructura cristalina del complejo, obligó a deducir la localización del centro activo por medio de análisis de la conservación de los residuos, de *blind docking* (anclaje a ciegas) y estructura de superimposición. Un análisis comparativo de los residuos catalíticos de las estructuras resueltas de (lacZ de *E. coli*) produjo, como resultado, una perfecta conservación de dos restos de ácido glutámico, Glu-564 y Glu-645, correspondiente a los residuos 461 (ácido catalizador) y 537 (Nucleófilo) en el sistema lacZ de *E. coli*.²⁶⁰ La estructura de la cadena A de lacZ (AP ID:1PX3) fue superpuesta al modelo utilizando PyMOL. Se observó una muy buena superposición de los residuos analizados lo que podría representar un típico centro activo de β -galactosidasa en la que los dos residuos de glutámico se colocaron a una distancia de 5,5 Å, la distancia usual para esta clase de enzimas. Finalmente, se realizó un anclaje a ciegas utilizando toda la estructura como la cuadrícula utilizada y los resultados confirmaron el hipotético centro activo.

3.3.6.3. Docking

Se realizaron dos docking: inicialmente el pNF- β -Gal se acopló en el centro activo para determinar la posición de la molécula en el intermedio glicosil-enzima. Con este objetivo, se seleccionó la mejor estructura de acuerdo a la geometría (Lo suficientemente cerca para el nucleófilo Glu-645) y criterios energético (energía favorable) para finalmente establecer un enlace covalente entre el residuo Glu-645 y la galactosa. En cuanto al segundo acoplamiento, el complejo glicosil- enzima fue utilizado para realizar un acoplamiento con

el GlcNAc, se seleccionó la mejor solución teniendo en cuenta, solamente, criterios energéticos y se tomó como una estructura de partida para posteriores estudios de dinámica molecular.

Todos los procedimientos de docking se llevaron a cabo con el software Autodock 4,¹⁷³ con un 60 x 60 x 60 puntos alrededor de la red en el cuadro del residuo Glu-645, para abarcar todos los residuos implicados en el mecanismo, y con un espaciado de malla de 0,375 Å°. Se seleccionó un algoritmo genético Lamarckiano con los parámetros estándar.

3.3.6.4. Parametrización del disolvente

Uno de los disolventes experimentales, a saber: 1,3-bis (2,2,2-trifluoroetoxi) propan-2-ol (GC8) se utilizó para solvatar la proteína y simular el sistema con el fin de modelar el cambio en la estereoselectividad inducida por el disolvente y obtener una visión de los detalles moleculares de este proceso. Debido a la falta de parámetros de dicho disolvente para el campo de fuerza del programa GROMOS 96 43a1, se llevó a cabo la parametrización de esta molécula. La estructura fue optimizada dentro del marco de la densidad funcional teórica (DFT), en el nivel de B3LYP/6-31G **, utilizando el paquete MPQC (*“Massively Parallel Quantum Chemistry”*). Todos los parámetros (longitudes de enlace, ángulos y diedros) y las cargas fueron extraídos de los cálculos del campo de fuerza estándar.

Para comprobar los parámetros derivados, un sistema de prueba se estableció formando una caja cúbica de 216 moléculas de GC8. Este cuadro fue equilibrada en 300 ps a 298 K y 1 atm. A continuación, una producción de 5 ps fue llevada a cabo en las mismas condiciones de presión y temperatura. Grabando los valores de posición y energía cada 1ps. Finalmente, la densidad fue calculada y comparada con los valores experimentales, confirmando una buena aproximación (densidad experimental = 1330 kg.m⁻³,²⁶¹ densidad calculada = 1360 kg.m⁻³).

3.3.6.5. Dinámica molecular:

Se crearon simulaciones de dinámica molecular con la mejor solución de docking y el sistema intermedio glicosil-enzima. Los parámetros adoptados en GROMOS 96 43a1 se

utilizaron para la proteína, mientras que los parámetros necesarios para el residuo galactosa-glutámico se obtuvieron de manera compatible con el campo de fuerza. Los parámetros para el GlcNAc fueron extraídos de Dundee PRODRG 2.5 Server (beta) (http://davapc1.bioch.dundee.ac.uk/cgi-bin/prodrgr_beta) y se comprobaron las cargas.

Una minimización inicial del complejo se desarrollo con 500 pasos de descenso rápido seguido de 1500 pasos de gradientes conjugados de Polak-Ribiere. El complejo minimizado fue solvatado en dos cajas cúbicas diferentes, cumpliendo los requisitos mínimos de distancia de 1,2 nm entre cualquier átomo del complejo y las caras de las cajas. La primera caja fue llenada con moléculas de agua para reproducir las condiciones experimentales para la enzima, mientras que la segunda fue llenada con una mezcla de moléculas de agua y moléculas de GC8 para reproducir las condiciones experimentales en las que se observó el cambio en la regioselectividad. Luego, se realizó para cada caja, un nuevo proceso de 500 pasos de minimización de descenso rápido y luego 3000 pasos de gradientes conjugados. Los sistemas fueron equilibrados por 100 ps a 298K para moles, volumen y temperatura conservados y luego otros 100 pasos a 298K para moles, presión y temperatura conservados.

3.4. SÍNTESIS DE OLIGOSACÁRIDOS CON β -GALACTOSIDASAS DE *T. thermophilus* HB27

Se trabajó con tres tipos de catalizadores termófilos: extractos celulares de HB27, enzimas recombinantes y enzimas inmovilizadas. Se caracterizaron los diferentes biocatalizadores de origen termófilo, se asumieron como condiciones de reacción aquellas determinadas como óptimas durante el proceso de caracterización: pH, tipo de tampón, concentración óptima del tampón. De los catalizadores utilizados, se evaluó primeramente su actividad en medio acuoso tamponado, posteriormente, se evaluó su comportamiento en medios con 30% v/v de líquidos iónicos y finalmente en medios con disolventes verdes como cosolventes a una concentración 2,00 M.

3.4.1. Producción y optimización de biocatalizadores termófilos

Se utilizaron extractos celulares de tres cepas de *T. thermophilus* HB27: I) extractos inducidos con celobiosa de la cepa original (wild type), II) extractos cultivados con celobiosa del mutante T42Kat (mutante con la enzima TTP0042 atrofiada: T42Kat) y III)

extractos celulares del mutante con sistema promotor ligado a la respiración anaerobia por nitrato reductasa: HB27Nar, este último no se utilizó como catalizador, sino que se purificó hasta obtener una enzima recombinante TTP0042 expresada en *T. thermophilus* y no en *E. coli*. También se clonó la enzima TTP0222 y TTP0042 de *T. thermophilus* y se expresaron en *E. coli* tal y como se detallan más adelante:

3.4.1.1. Obtención de los extractos celulares termófilos

En un trabajo en colaboración con la Dra. María Pérez y el Dr. Eloy Ferreras,²⁶² se determinó que la presencia de celobiosa en los cultivos de *T. thermophilus* induce la actividad de tipo β -glicosidasa con especial actividad sobre enlaces de β -galactosa y β -fucosa. Partiendo de la información disponible, se cultivó la cepa HB27 en medio THff diluido $\frac{1}{4}$ y enriquecido con celobiosa (0,1 %-0,2 %) a 70 °C. Las bacterias se colectaron por centrifugación a 6500 rpm durante 10 minutos a 4°C y se unificaron las muestras en un solo pellet. El pellet se resuspendió en tampón fosfato 50 mM pH 7,30. Las células se sonicaron en al menos cinco ciclos en las condiciones descritas en el punto 3.1.4.9. Los extractos obtenidos se centrifugaron a 15000 rpm por 30 minutos a 4 °C. Se desecha el sólido y se conserva el líquido sobrenadante.

El grupo del Prof. Dr. Berenguer ha desarrollado una cepa mutante de HB27 denominada T42kat. Este mutante no codifica la enzima TTP0042 debido a una mutagénesis sobre ella y en su lugar produce una proteína atrofiada.²⁶² Esta cepa se utilizó como catalizador permitiendo analizar el rol de la enzima TTP0042 en los extractos de HB27 inducido, dando lugar a un blanco negativo. La cepa mutante T42kat se cultivó en las mismas condiciones que el HB27 inducido y se produjeron extractos celulares de ésta, bajo las mismas condiciones utilizadas con la cepa silvestre (HB27).

3.4.1.2. Caracterización de los extractos celulares de HB27 inducido

El estudio de las condiciones óptimas para extractos celulares de HB27 inducido con celobiosa se realizó exclusivamente para este biocatalizador y no para su cepa mutante T42kat, la cual se utilizó como un blanco experimental. Utilizando extractos celulares se determinaron los parámetros de pH óptimo, tampón óptimo, salinidad del tampón y fuerza iónica (como NaCl), temperatura óptima y estabilidad térmica en la temperatura óptima.

pH óptimo

Los extractos obtenidos se diluyen hasta obtener lecturas espectrofotométricas de hidrólisis de *pNF-β-Gal* entre 0,1 y 0,9 a 410 nm, utilizando el método discontinuo descrito en el punto 3.2.4.2.²⁵³ La hidrólisis se midió a 80°C utilizando *pNF-β-Gal* y *pNF-β-Fuc* como sustratos debido al potencial interés de estos extractos en la síntesis de disacáridos de tipo β-fucósidos y β-galactósidos. Las mediciones enzimáticas se realizaron en presencia de tampones citrato/fosfato de sodio 50 mM en el rango de pH desde 4,00 hasta 5,50 y fosfato de sodio 50 mM desde 5,50 hasta 8,50.

Los valores de pH de cada disolución se midieron a 25°C. En todos los casos el volumen del tampón superó al de la muestra en casi 20 veces, para garantizar un ajuste aproximado del pH al del tampón utilizado. La actividad enzimática obtenida para cada valor de pH se reportó como actividad relativa respecto al valor máximo hallado y el error promedio del experimento (expresado como desviación estándar) no superó el 5%.

Tampón óptimo

Una vez determinado el valor de pH óptimo de los extractos celulares en las condiciones descritas en el punto anterior, se repitió el ensayo de actividad enzimática para *pNF-β-Gal* y *pNF-β-Fuc* a 80°C en las mismas condiciones del método discontinuo descrito en el punto 3.2.4.2, con los tampones que presentan capacidad amortiguadora a pH 5,50 que fue el valor de pH determinado como óptimo. Los tampones utilizados en este caso fueron: ácido cítrico/citrato de sodio, citrato/fosfato de sodio, fosfato de sodio, ácido acético /acetato de sodio y tampón MES.

Salinidad adecuada del tampón y fuerza iónica

Una vez seleccionado el tampón óptimo para la enzima se realiza un estudio de actividad enzimática (80°C y los sustratos *pNF-β-Gal* y *pNF-β-Fuc*) con el tampón seleccionado y se estudia el efecto de la salinidad propia del tampón a concentraciones de 25, 50, 75 y 100 mM. Una vez seleccionado el valor adecuado de salinidad para cada tampón se analiza la actividad enzimática (en las mismas condiciones) a concentraciones de salinidad, utilizando

NaCl como fuente de iones. Las concentraciones de NaCl utilizadas fueron 25, 50, 75 y 100 mM.

Temperatura óptima

Una vez seleccionado el tampón óptimo y su concentración (fosfato de sodio 50 mM, pH 5,50 para la actividad β -galactosidasa y pH 6,50 para la actividad β -fucosidasa) se realiza un estudio de temperatura óptima con éstos tampones, midiendo la actividad enzimática por el método continuo descrito en el punto 3.2.4.2, a diferentes temperaturas: 65 °C, 70 °C, 75 °C, 80 °C, 85 °C, 90 °C y 95°C.

Estabilidad térmica

Se analizó la estabilidad térmica de los extractos celulares de HB27 inducido a 90 °C por ser la temperatura máxima de actividad hidrolítica de éste biocatalizador. Para este ensayo se analizó la actividad enzimática de un extracto celular (3.5 mg proteína/mL) sometido a calentamiento a los tiempos 0h, 0,5h, 1h, 2h, 3h, 4h, 5h, 6h, 7h, 8h y 24h.

Constante de Michaelis-Menten (K_M) y Velocidad Máxima (V_{max})

En las condiciones de máxima actividad enzimática se decidió analizar el comportamiento cinético de los extractos celulares de HB27 inducido con pNF- β -Gal como sustrato, dado que para efectos de síntesis de oligosacáridos ésta es la sustancia de mayor interés por sus aplicaciones farmacológicas e inmunológicas^{369, 370}.

Para este ensayo se midió la velocidad media de hidrólisis de sustrato a 90°C (punto 3.2.7.) durante 8 minutos en presencia de 0,072 mg de proteínas totales provenientes del extracto celular de HB27 inducido (0,47 mU totales en un medio 1 mM de sustrato) disueltas en un volumen final de 200 μ L con tampón fosfato de sodio pH 5,50 y 25 mM. Las concentraciones de sustrato fueron 1, 2, 4, 6, 8, y 12 mM respectivamente. Se representaron las mediciones obtenidas en un gráfico de doble inversa (Lineweaver-Burk) y se determinó por regresión lineal de la recta los valores de V_{max} y K_M para este biocatalizador.

3.4.1.3. Obtención de enzimas recombinantes expresadas en *E. coli*.

Se utilizó el plásmido PET28b(+) como vector para albergar genes provenientes de *T. thermophilus* y así agregar un extremo adicional de ADN que codifica una porción peptídica que entre otros aminoácidos posee seis histidinas añadidas al grupo amino terminal de las proteínas a expresar (his₆tag), que se ha utilizado ampliamente en la expresión de proteínas recombinantes en años recientes. Esta porción adicional de la cadena de aminoácidos aumenta ligeramente el peso molecular de la proteína pero se dice que no afecta las propiedades generales de la enzima.⁸² Los genes clonados de HB27 fueron facilitados por el Dr. E. Ferreras del CBMSO, CSIC (Madrid) con éstos genes se realizó la transformación de bacterias de *E. coli* para su posterior sobreexpresión y purificación.

Amplificación del ADN

Se facilitó un plásmido que contiene el gen a clonar, dicho plásmido se amplificó al introducirlo en cepas competentes de *E. coli* DH5 α , las cuales se reproducen y replican el ADN disponible. La transformación genética se realiza mediante choque térmico (ver procedimientos generales), las células transformadas se cultivan por una hora en medio LB y luego se inoculan en medio LB con 30 μ g/mL de kanamicina (LB_{kana30}), este antibiótico actúa como medio selectivo, ya que las bacterias que no hayan asimilado el plásmido no resisten el antibiótico, mientras que los organismos transformados si lo hacen. Las bacterias se cultivaron en placas de agar LB_{kana30} y se seleccionan colonias que crecen en este medio para cultivarlas en medio líquido LB_{kana30} durante 18 horas, posterior a ello se extrae el ADN del nuevo plásmido PET28b(+) con el inserto añadido.

Extracción y ligación del gen

Una vez replicado el plásmido con el inserto, se toman 3 μ g de ADN y se digieren 12 horas a 37 °C con las enzimas de restricción HindIII y NdeI, en un medio con tampón Red, luego se inactivan las enzimas de restricción por calentamiento a 70 °C durante 30 minutos. El gen cortado se observa por electroforesis en geles de agarosa y se recorta de los mismos con un bisturí, se purifica el ADN separado por medio del kit Wizard ® y luego de esto se

desfosforila en los extremos del ADN con una fosfatasa alcalina durante 12 horas a 37 °C. La fosfatasa también se inactiva a 70 °C durante 30 minutos.

Guardando una relación molar de 4:1 (inserto:vector), se preparan los nuevos plásmidos modificados con 0,5 µL de la ligasa T4 y 1 µL de tampón para la ligación. Se realiza un blanco utilizando agua en lugar del inserto, para cada vector analizado. Las mezclas se dejan toda la noche en el termociclador. La ligación preparada se añade a 50 µL de bacterias *E. coli* HD5α y lo mismo se realiza con el blanco, se realiza la transformación mediante choque térmico (punto 3.2.1.2) y se cultivan en placas de agar con 30 µg/mL de kanamicina. Se hace una comparación entre el blanco y las bacterias transformadas.

Transformación e inducción de la expresión del gen TTP0042

El plásmido construido se analiza por medio de la técnica PCR (*polimerase chain reaction*), con los oligos: AAACATATGACCGAGAACGCCGA (para la enzima NdeI) y AAAAGCTTAGGTCTGGGCCCCGC (para la enzima HindI) y de esta forma determinar la ligación efectiva del inserto. Los resultados de este proceso se analizaron por electroforesis de ADN en geles de agarosa. Una vez comprobada la efectiva ligación del inserto se colocan 50 µL de bacterias de *E. coli* BL21 y se les añaden 3 µL de disolución que contiene el plásmido con el inserto. Se realiza la transformación por choque térmico, las bacterias se incuban 1 hora a 37°C con agitación y sin antibiótico. Luego de la incubación se colocaron las bacterias en un medio sólido de agar con glucosa al 0,6% y el antibiótico correspondiente. Se incubaron las placas toda la noche a 37°C.

Se seleccionaron al azar 10 colonias de células transformadas y se cultivaron en estos tubos con 2 mL de medio de cultivo por 5 horas a 37 °C y se transfirieron 50 µL de bacterias a nuevos tubos con medio LB ampicilina y 0,05 % de glucosa por cinco horas. En condiciones estériles se adicionó isopropil-β-D-tiogalactopiranosido (IPTG) para alcanzar un medio 0,5 mM del mismo y generar la inducción en la expresión de proteínas recombinantes, las bacterias se incubaron por 5 horas. Se realizaron pruebas preliminares de actividad a los extractos celulares de éstas células y se observó la inducción por medio de electroforesis en presencia de SDS.

Cultivo de bacterias inducidas

Se seleccionaron las bacterias que mostraron expresión de proteínas recombinantes en el punto anterior, para ser cultivadas en matraces con 1L de medio LB_{kana30} y 0,05 % de glucosa hasta alcanzar una densidad óptica entre 0,6 y 0,8. Una vez alcanzada se adicionó IPTG para generar un medio aproximado a 0,5 mM y se cultivaron por cinco horas para expresar las proteínas de interés. Se realiza un blanco con las mismas bacterias cultivadas en pequeña escala (2 mL) en presencia de 0,5 % de glucosa y medio LB_{kana30} a 37°C. Se analiza por electroforesis desnaturalizante la sobreexpresión de proteínas entre las bacterias inducidas y el blanco.

3.4.1.4. Caracterización de la enzima TTP0042

En el presente trabajo, se emplearon dos enzimas recombinantes: la primera de ellas: TTP0042 se utilizó dada su gran actividad hidrolítica y sintética, esta enzima se clonó tanto en *E. coli* como en *T. thermophilus* HB27Nar, la segunda enzima: TTP00222 se utilizó de forma exploratoria para medir las actividades de otras galactosidasas presentes en *T. thermophilus* y su posible efecto en los extracto celulares.

La enzima TTP0042 fue caracterizada bioquímica⁷² y cinéticamente⁷⁴ por sus descubridores. Posteriormente Pérez¹³ realizó un estudio de temperatura óptima y estabilidad térmica de ésta enzima. Por este motivo se caracterizó únicamente el pH y el tampón óptimo para este biocatalizador a 80 °C en un medio 1 mM de *p*NF-β-Gal.

pH óptimo

Se diluye una muestra de enzima purificada para obtener lecturas espectrofotométricas de hidrólisis de *p*NF-β-Gal entre 0,1 y 0,9 a 410 nm, se someten primeramente a un estudio de actividad enzimática a 80 °C utilizando el método discontinuo²⁵³, para ello se emplean los tampones citrato/fosfato de sodio 50 mM en el rango de pH desde 4,00 hasta 5,50 y fosfato de sodio 50 mM desde 5,50 hasta 8,50. Los valores de pH se midieron a 25 °C. En todos los casos el volumen del tampón superó al de la muestra en casi 20 veces, para garantizar un ajuste aproximado del pH al del tampón utilizado. La actividad enzimática obtenida para

cada valor de pH se reportó como actividad relativa respecto al valor máximo hallado y el error promedio del experimento (expresado como desviación estándar) no superó el 5 %.

Tampón óptimo de TTP0042 his₆tag

Una vez determinado el valor de pH óptimo de la enzima, se repite el ensayo de actividad enzimática en las mismas condiciones (80 °C, para pNF-β-Gal y pNF-β-Fuc) con los tampones que pueden utilizarse en dicho valor de pH para estimar el tampón óptimo. Los tampones utilizados en este caso fueron: ácido cítrico/citrato de sodio, citrato/fosfato de sodio, fosfato de sodio, ácido acético /acetato de sodio y tampón MES.

3.4.1.5. Obtención de enzimas recombinantes en *Thermus thermophilus* HB27Nar

La expresión de enzimas en *Thermus thermophilus* HB27Nar se realizó con el plásmido PMKE2 diseñado por el grupo del Prof. Dr. Berenguer como vector para albergar genes provenientes de HB27²⁶³ al cual se le ha añadido la codificación genética de una cola de histidinas en el extremo amino terminal. El medio de cultivo para esta cepa fue TH_{kana30}, la transformación se realizó por electroporación (punto 3.2.2) y se siguieron las mismas normas de transformación, comprobación e inducción utilizadas en *E. coli*. La inducción no se realizó en presencia de IPTG ni de glucosa, sino que se alcanzó dejando reposar los cultivos con una densidad óptica a 550 nm entre 0,6 y 0,8 en presencia de nitrato de potasio 40 mM y anoxia a 70 °C durante 12 horas (la anoxia se consiguió por calentamiento a 70°C sin agitación), para inducir el promotor de la respiración nitrato reductasa del plásmido PMKE2.

Purificación de enzimas recombinantes con colas de histidina

Para la obtención de la enzima recombinante TTP0042 expresada en HB27Nar se centrifugaron las bacterias inducidas a 6500 rpm por 10 minutos y 4°C. El pellet obtenido se resuspendió con tampón fosfato de sodio 25 mM, pH 6,00. Las células fueron resuspendidas en volúmenes de 35 mL a 100 mL según el tamaño del pellet y se rompieron al hacerse pasar dos veces por una prensa francesa a 20000 libras por pulgada cuadrada (psi). Los extractos obtenidos se centrifugaron a 15000 rpm por 30 minutos a 4 °C. Se eliminó el sólido generado y el sobrenadante se hizo pasar por una columna de níquel (II)-

agarosa (1mL) siguiendo el protocolo descrito por el fabricante (BioRad, ver punto 3.2.5). Se recogió la fracción correspondiente a la proteína recombinante con colas de histidinas, se eliminó el imidazol utilizando un tubo de ultra centrifugación Amicon[®] (Millipore) a 4000 rpm por 10 minutos a 4°C. La proteína se resuspendió en un tampón fosfato de sodio 50 mM pH 6.00. Se determinó la actividad relativa de cada proteína purificada y se analizó su pureza por electroforesis en presencia de SDS.

3.4.2. Síntesis de disacáridos utilizando biocatalizadores termófilos en medios acuosos

Se evaluó la actividad sintética en medios acuosos tamponados, de los dos biocatalizadores de fuentes termófilas con mayor actividad: los extractos celulares de HB27 inducido con celobiosa y la enzima recombinante TTP0042 expresada en *E. coli*. Además, para comprobar los datos obtenidos con controles experimentales, se realizaron reacciones con los extractos celulares del mutante de *T. thermophilus* T42Kat y con la enzima recombinante TTP0042 PNar expresada en *T. thermophilus*.

3.4.2.1. Reacciones de transglicosidación con extractos celulares de HB27 inducido

Las reacciones de transglicosidación utilizando extractos celulares de HB27 se realizaron a 80°C con agitación a 220 rpm, las concentraciones molares de donador:aceptor fueron de 1:5 respectivamente, colocando para ello 0,0425 milimoles de donador (*p*NF- β -Gal y *p*NF- β -fuc) y 0,213 mmoles de cada aceptor a los cuales se les adicionó 1,0 mL de tampón fosfato de sodio pH 5,50 y 25 mM. Para las reacciones con clorhidratos de azúcares (GlcNH₂.HCl y GalNH₂.HCl) el pH se ajustó hasta 6,0 con hidróxido de sodio 5 M y se siguió con papel indicador de pH. Una vez atemperada la mezcla, se tomó una alícuota de 50 μ L del medio inicial de reacción y posteriormente se adicionaron 9 unidades enzimáticas de extracto celular dando inicio a la reacción.

Se tomaron alícuotas de la reacción cada treinta minutos, hasta finalizar a las 3 horas, cada alícuota se trató con 450 μ L de metanol y se guardaron inmediatamente a -20°C para finalizar la reacción. Las alícuotas se centrifugaron y se filtraron (0,22 μ m de poro) para ser luego analizadas por HPLC (punto 3.1.4.3) con ELSD como detector universal de los compuestos formados, fue necesario utilizar detectores UV a 317 nm para identificar los

grupos *p*-nitrofenilos liberados en la reacción y DC a 317 nm para detectar la presencia de los grupos fenilos cercanos a carbonos quirales (presumiblemente el carbono anomérico) y con esto diferenciar los productos de autocondensación $\beta[1\rightarrow3]$ y $\beta[1\rightarrow6]$ que se describen en la literatura consultada.⁸³

Screening de aceptores para reacciones de transglicosidación con extractos celulares de HB27 inducido.

Se estudiaron los diferentes aceptores que los extractos de HB27 podían reconocer en reacciones de transglicosidación, utilizando la metodología general para este tipo de reacciones antes descrita. Se realizó un screening de aceptores para reacciones en donde se uso *p*NF- β -Gal como donador. Los aceptores utilizados fueron *p*NF- β -Gal (reacción de autocondensación sin otros aceptores), Gal, Man, Fuc, Glc, GlcNH₂.HCl, GalNH₂.HCl, GlcNAc y GalNAc.

Estudio sobre reconocimiento de aceptores para reacciones de transglicosidación con extractos celulares de la cepa mutante T42kat.

Con base en los resultados anteriores para reacciones de transglicosidación de mayor interés y utilizando la metodología general para este tipo de reacciones previamente detallada, se realizó un screening de aceptores utilizando como biocatalizador los extractos celulares de T42kat. Dada la baja actividad en hidrólisis con este catalizador, no fue posible alcanzar las 9 unidades enzimáticas de reacción, por lo que se adicionó la misma cantidad de proteínas totales utilizada en las reacciones de transglicosidación para HB27 inducido (43,3 mg de proteínas totales) y *p*NF- β -Gal como donador. Los aceptores utilizados fueron *p*NF- β -Gal (reacción de autocondensación sin otros aceptores), GlcNH₂.HCl, GalNH₂.HCl, GlcNAc y GalNAc.

3.4.2.2. Reacciones de transglicosidación con enzimas recombinantes en medios acuosos tamponados

Las reacciones de transglicosidación utilizando enzimas recombinantes provenientes de HB27 (TTP042 en *E. coli* y HB27Nar, TTP0222 his₆tag en *E. coli*) se realizaron a 65°C con

agitación a 220 rpm, las concentraciones molares de donador: aceptor fueron de 1:5 respectivamente, colocando para ello 0,0425 milimoles de donador (*p*NF- β -Gal) y 212,5 milimoles de cada aceptor a los cuales se les adicionó 1,0 mL de tampón fosfato de sodio pH 6,00 y 50 mM. Para las reacciones con clorhidratos de azúcares (GlcNH₂.HCl y GalNH₂.HCl) el pH se ajustó hasta 6,0 con hidróxido de sodio 5 M y se estimó con papel indicador de pH. Una vez atemperada la mezcla, se tomó una alícuota de 50 μ L del medio inicial de reacción y posteriormente se adicionaron 9 unidades enzimáticas para dar inicio a la reacción.

Se tomaron alícuotas de la reacción cada treinta minutos, hasta finalizar a las 3 horas, cada alícuota se trató con 450 μ L de metanol y se guardaron inmediatamente a -20°C para finalizar la reacción. Las alícuotas se centrifugaron y se filtraron (0,22 μ m de poro) para ser luego analizadas por HPLC (ELSD, UV y DC) en las condiciones descritas en el punto 3.1.4.3. La configuración preliminarmente asignada a los productos fue en todos los casos la más reiterada en la literatura para los compuestos sintetizados por ésta enzima, siendo: β [1 \rightarrow 3]^{110, 116, 117}. Los productos de mayor rendimiento obtenidos en las reacciones fueron purificados y elucidados estructuralmente por RMN. Siendo los más importantes: *N*-acetil lactosamina (Gal β [1 \rightarrow 4]GlcNAc) y *N*-acetil alolactosamina (Gal β [1 \rightarrow 6]GlcNAc), cuyos espectros de RMN aparecen interpretados en la sección 3.3.2.

Screening de aceptores para reacciones de transglicosidación con TTP0042 his₆tag expresada en E. coli

Se estudiaron los diferentes aceptores que la enzima TTP0042 his₆tag podía reconocer en reacciones de transglicosidación, utilizando la metodología antes descrita. El donador utilizado fue *p*NF- β -Gal y los aceptores utilizados fueron *p*NF- β -Gal (reacción de autocondensación sin otros aceptores), Gal, Man, Fuc, Glc, GlcNH₂.HCl, GalNH₂.HCl, GlcNAc y GalNAc para la enzima expresada en *E. coli*.

Screening de aceptores para reacciones de transglicosidación con TTP0042 his₆tag expresada en HB27Nar

Con la finalidad de analizar los posibles efectos del organismo productor de la enzima recombinante (punto 3.4.1.3.), se decidió expresar la propia enzima TTP0042 his₆tag en *T. thermophilus* HB27Nar (punto 3.4.1.5.) y analizar los aceptores que la enzima puede reconocer en reacciones de transglicosidación, utilizando las mismas condiciones de reacción (punto 3.4.2.2.) que con la enzima expresada en *E. coli*. Los aceptores evaluados fueron: pNF-β-Gal, GlcNH₂.HCl, GalNH₂.HCl, GlcNAc y GalNAc.

Reacciones de transglicosidación con TTP0222

Considerando los resultados obtenidos con extractos celulares de HB27 y tomando en cuenta que la enzima TTP0222 está presente tanto en dichos extractos como en los de T42kat, se decidió analizar la actividad de ésta enzima en las mismas condiciones de síntesis de TTP0042 his₆tag. Las condiciones de reacción fueron las mismas descritas utilizadas en el screening de aceptores de TTP0042 his₆tag, se realizó una única reacción con pNF-β-Gal como donador y GlcNAc como aceptor.

3.4.3. Síntesis de disacáridos con biocatalizadores termófilos en presencia de líquidos iónicos

Se evaluó el efecto de los líquidos iónicos como cosolventes al 30% v/v en los medios de reacción. Se utilizó esta cantidad, dado que es la misma proporción de disolvente empleada con las enzimas de Biolacta (punto 3.3.4) y según la literatura favorece la actividad de la β-galactosidasa de *B. circulans*.¹²⁶ Como catalizadores se utilizaron los extractos celulares de *T. thermophilus* HB27 inducido con celobiosa y la enzima recombinante TTP0042 expresada en *E. coli*.

3.4.3.1. Reacciones de transglicosidación con extractos celulares de HB27 inducido en líquidos iónicos.

Considerando la reacción de mayor importancia sintética obtenida una vez realizado el screening de aceptores con los extractos celulares de HB27 inducido, se analizó la actividad sintética de tales extractos en presencia de líquidos iónicos.

Se utilizaron 51,2 mg de *p*NF- β -Gal como donador (aproximadamente 0,17 M) y 188 mg de GlcNAc como aceptor (aproximadamente 0,85 M), se adicionó a la mezcla de reactivos 700 μ L de tampón fosfato de sodio pH 5,50 25 mM y 300 μ L de cada líquido iónico (aproximadamente 30% v/v). La reacción dio inicio al agregar 36 unidades enzimáticas para cada medio de reacción y se monitoreó por HPLC en las condiciones previamente descritas. Los líquidos iónicos utilizados en este punto fueron: [Bmim][PF₆], [Omim][PF₆], [CPMA][MeSO₄] y [Toma][Ntf₂].

3.4.3.2. Reacciones de transglicosidación con TTP0042 his₆tag, clonada en *E. coli*, en líquidos iónicos

Se colocaron 51,2 mg de *p*NF- β -Gal como donador (aproximadamente 0,17M) y 188 mg GlcNAc como aceptor (aproximadamente 0,85M), los reactivos se disolvieron a 65°C con 1,00 mL de tampón fosfato de sodio pH: 6,00 50 mM. El inicio de la reacción se alcanzó por adición de 36 unidades enzimáticas. La misma reacción se repitió utilizando mezclas de tampón con 30% (v/v) de líquidos iónicos. Los líquidos iónicos utilizados en este punto fueron: [Bmim][PF₆], [Omim][PF₆], [Bmim][FAP], [Emim][PF₆], [CPMA][MeSO₄], [Troma][Ntf₂]. El seguimiento de la reacción se hizo en HPLC bajo las condiciones descritas en el punto 3.1.4.3.

Los resultados obtenidos en el primer experimento con líquidos iónicos y la enzima TTP0042 fueron exitosos en casi todos los líquidos iónicos probados. Por ello, posteriormente, se realizó un estudio del efecto de la concentración del líquido iónico sobre la reacción de transglicosidación. Para ello, se realizaron reacciones de síntesis utilizando 0%, 5%, 10%, 20% y 30% de los líquidos iónicos: [Bmim][PF₆], [Omim][PF₆], [Emim][PF₆], [CPMA][MeSO₄] y [Troma][Ntf₂].

3.4.4. Reacciones de transglicosidación con TTP0042 his₆tag en disolventes verdes

Se modificaron las condiciones de reacción con la enzima TTP0042 his₆tag (clonada en *E. coli*) para obtener mejores rendimientos con la reacción de interés. En este caso se colocaron 51,2 mg de pNF-β-Gal como donador (aproximadamente 0,17M) y 188 mg GlcNAc como aceptor (aproximadamente 0,85 M), los reactivos se disolvieron a 65 °C con 1,00 mL de tampón fosfato de sodio pH: 6,00 50 mM. El inicio de la reacción se alcanzó por adición de 36 unidades enzimáticas. La misma reacción se repitió con tres tipos de disolventes verdes: 1- Derivados cíclicos del glicerol procedentes de Biomasa (Cognis GmbH): G1, G2, G3 2- Derivados de la dimetilamida, también procedentes de Biomasa, Cognis GMBH: DMA1, DMA2, DMA3 y 3- Derivados del glicerol sintetizados por el grupo del Profesor José I. García del CSIC, Zaragoza: GC4, GC5, GC6, GC7, GC8, GC9, GC10, GC11 y GC 12. Las estructuras de todos éstos disolventes verdes, aparecen en el esquema 18. Su caracterización y datos previos de actividad se muestran en las tablas 19 y 20. La concentración final de cada uno éstos disolventes fue 2M en una mezcla de tampón citrato-fosfato de sodio 50 mM pH 5,00 a 37 °C. El seguimiento de la reacción se realizó por HPLC en las condiciones descritas en el punto 3.1.4.3. La reacción se consideró finalizada a las 3 horas y se detuvo por adición de 9 volúmenes de metanol a la muestra de reacción.

Finalmente, con el objetivo de determinar el efecto que poseen las concentraciones de los disolventes verdes sobre la regioselectividad de la enzima, se decidió repetir las reacciones de transglicosilación descritas en el presente apartado, con aquellos disolventes ue presentaron resultados importantes (rendimientos mayores al 70% en la síntesis de Galβ(1→4)GlcNAc: G2, GC4, GC9, GC12 y DMA1), variando las concentraciones de disolvente: desde 0,25M hasta 2,00M. Se representó el porcentaje de Galβ(1→4)GlcNAc sintetizado en cada reacción respecto a la cantidad de disolvente verde utilizado.

3.4.5. Estudios de interacciones moleculares

Dados los buenos resultados obtenidos con los líquidos iónicos y la enzima TTP0042 en las reacciones de síntesis de disacáridos se decidió evaluar la interacción enzima-líquido iónico

por medio de las técnicas SPR, dicroísmo circular y modelado molecular. El detalle de trabajo realizado fue el siguiente:

3.4.5.1. Estudios por SPR

Condiciones generales de trabajo en SPR

Para el uso de técnicas relativas al SPR se contó con la colaboración del Dr. Juan Treviño, de la Unidad de Interacciones Moleculares del PCM. Los ensayos se llevaron a cabo en presencia tampón fosfato de sodio 50 mM pH 7,00 con 0,05% de P20[®] como surfactante a 25 °C y un flujo de 5 µL/min en un Biacore 3000 (GE Healthcare, Uppsala, Suecia), utilizando chip comercial CM-5 del sensor (GE Healthcare, Uppsala, Suecia), este chip está funcionalizado con grupos carboxilo en la superficie de dextranos.

Estudio de preconcentración en SPR

La superficie del chip posee carga negativa debido a los grupos carboxilo. Sobre esta superficie se fluyen 10 µL de enzima 10 µg/mL en tampón ácido acético/ acetato de sodio para analizar el acercamiento enzima-superficie en función del pH, los valores de pH utilizados fueron: 4,0, 4,5, 5,0, 5,5 y 6,0. Con éstos valores se obtiene un gráfico de preconcentración que permite determinar el pH óptimo para la unión covalente de la enzima sobre la superficie del chip, en función del acercamiento por pH (Figura 16).

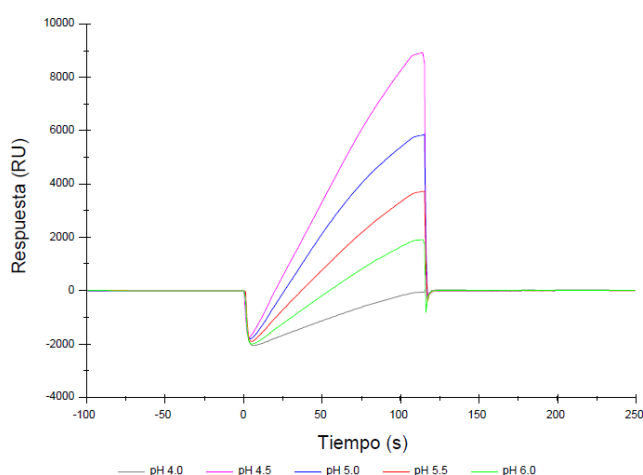


Figura 16. Estudio de preconcentración de la enzima TTP0042 sobre la superficie de un chip CM5.

Inmovilización de la enzima a la superficie del Chip

Se utilizaron dos celdas: Fc1 y Fc2. La primera como blanco y la segunda como celda de trabajo. Ambas celdas fueron activadas fluyendo sobre ellas una disolución de “*amine coupling kit*” de Biacore de la siguiente forma: I) 35 μL de EDC (clorhidrato de 1-etil-3-(dimetilaminopropil)-carbodiimida); II) 35 μL de NHS (*N*-hidroxisuccinimida), una vez activados los grupos carboxilo del dextrano se inmoviliza sobre la superficie Fc2: 10 μL de enzima (0,1 mg/mL) a pH 4.5 (determinado como óptimo en el estudio de preconcentración). Posteriormente, se fluyen en ambas superficies (Fc1 y Fc2) etanolamina 1M pH 8,50, con este procedimiento se bloquea la superficie del chip (Figura 17). En la celda Fc2 se logró inmovilizar un total de 6749 unidades de respuesta (RU).

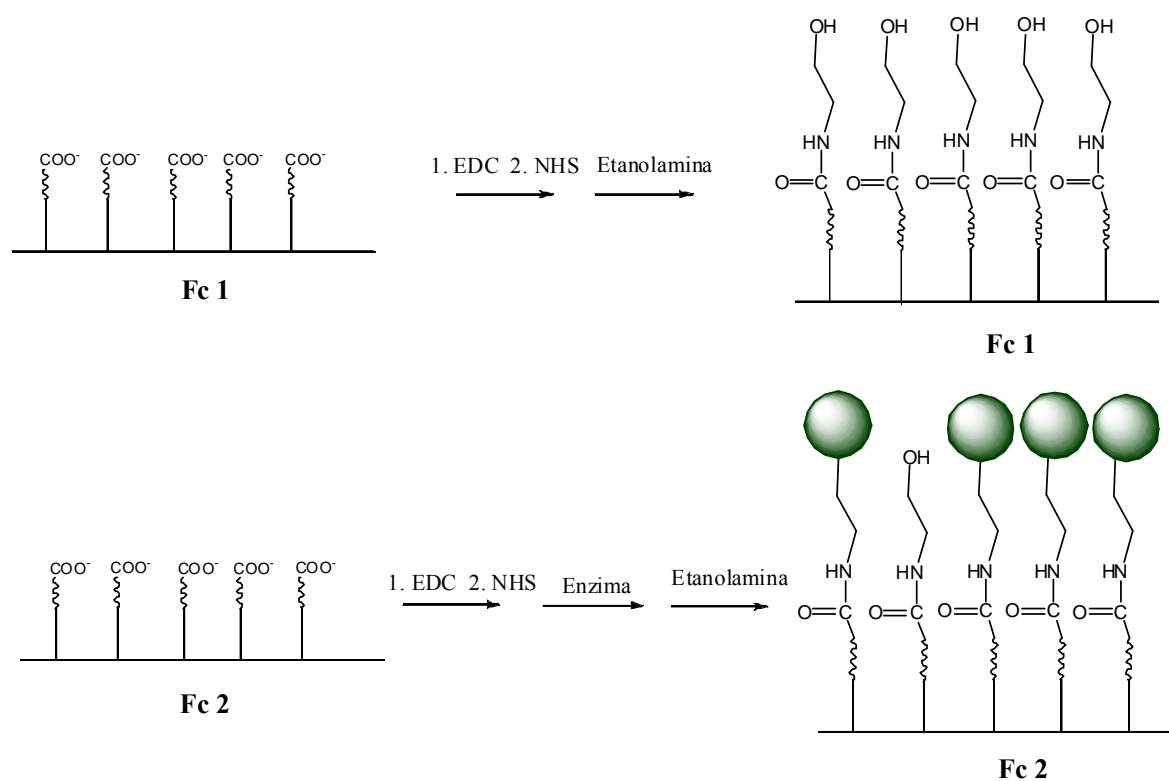


Figura 17. Funcionalización de las celdas Fc1 y Fc2 sobre un chip CM5.

Estudio de interacciones moleculares por SPR

Los líquidos iónicos utilizados son poco solubles en agua por lo que el trabajo en el SPR se limitó a la solubilidad máxima de éstos líquidos. Sobre la celda FC1 y FC2 se fluyeron las siguientes concentraciones de líquidos iónicos: 4,18, 8,36, 16,7, 25,1 y 33,5 mM de [Bmim][PF₆] y 1,19, 2,38, 3,56, 4,75, 5,94 y 7,13 mM de [Omim][PF₆]. Los ILs fueron disueltos en tampón de fosfato de sodio 50 mM pH 6,0, luego de una vigorosa agitación en un baño sónico. Con los valores medidos se realizó un gráfico de afinidad en el estado estacionario para determinar el valor de la constante cinética (K_D).

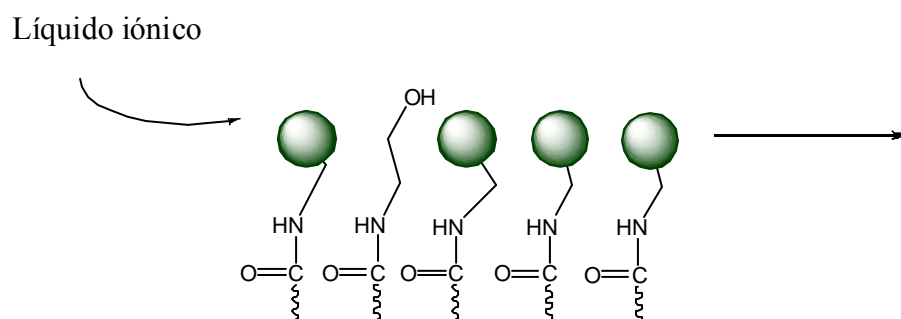


Figura 18. Interacción líquido iónico enzima sobre la superficie del chip funcionalizado.

3.4.5.2. Estudio por dicroísmo circular

Se analizaron los cambios conformacionales en la estructura secundaria de la proteína TTP0042 mediante la técnica de dicroísmo circular. Se utilizó un dicrógrafo Jasco-710 previamente calibrado con ácido D-10-canforsulfónico para registrar los espectros CD-UV lejanos de la enzima. Las mediciones se realizaron en celdas de 0,1 cm a 25 ° C. Se adquirieron cinco acumulaciones para cada espectro. La elipticidad se midió con un ancho de banda de 2 nm y una respuesta 2s. La elipticidad media por residuo (MRE por sus siglas en inglés) se calculó utilizando la ecuación 1. Se utilizó un peso molecular de 50664,2 Da para la enzima recombinante con el extremo polipeptídico (His₆tag) y un total de 450 residuos. La concentración inicial de la enzima fue 19.8 µM, en tampón fosfato de sodio 10 mM a pH 6,00.

$$MRE = \frac{100 \times \theta}{C \times N \times l}$$

Donde:

θ = grados de elipticidad observada.

C = Concentración molar de la proteína

N = número de residuos de la enzima

l = Longitud de la celca en cm

Ecuación 1. Cálculo de la elipticidad media por residuo (MRE).

Para este experimento se seleccionó el líquido [CPMA][MeSO₄] para analizar su efecto sobre la estructura secundaria de la enzima. Se utilizó este líquido por que de los distintos LIs estudiados este es soluble en agua, no tiende a hidrolizarse para generar ácido fluorhídrico y además presenta un notable efecto en la regioselectividad de la enzima a bajas concentraciones (5% y 10% m/v) respecto a otros LIs disponibles. Se realizó un blanco con el líquido iónico [CPMA][MeSO₄] para evaluar su espectro dicróico y su posible interferencia. Con este dato se determinó que este líquido es compatible hasta una concentración de 5% m/v para realizar espectros de DC.

Se determinó el espectro de DC para la enzima en condiciones nativas en tampón fosfato de sodio 10 mM a pH 6,00. Posteriormente se añadieron pequeñas cantidades de [CPMA][MeSO₄] (20% m/v) con el fin evaluar el efecto de su concentración sobre la estructura secundaria de la enzima. Se midieron los espectros de DC para las siguientes concentraciones finales de [CPMA][MeSO₄] en la cubeta: 0,08%, 0,15%, 0,50%, 1,50%, 3,0% y 5,0% m/v. Con esta información se graficó la MRE en función de la longitud de onda para cada una de las mezclas. Finalmente, se detectaron dos valles de absorción dicróica a 208 y 218 nm característicos de la enzima en condiciones nativas, por lo que se graficó su valor de MRE a distintas concentraciones de líquido iónico.

3.4.5.3. Estudio de Fluorescencia

Se analizó el espectro de emisión en fluorescencia de la enzima TTP0042 utilizando un espectrómetro de PTI modular. Se realizó la excitación de la proteína con una longitud de

onda de 295 nm, porque es altamente selectivo para el triptófano, la emisión fue adquirida de 310 nm a 500 nm. La excitación y emisión de ancho de banda se ajustó a los 2 nm, las mediciones se hicieron en celdas de 0,20 cm de paso de luz con un termorregulador TLC ajustado a 25°C. El análisis se realizó utilizando el software Spectra Félix 32. El espectro inicial fue hecho con la enzima TTP0042 a una concentración 19.8µM, en tampón fosfato sódico 10mM a pH 6,00, y luego se realizaron varias adiciones de [CPMA][MeSO₄] en la cubeta. Se registraron los espectros de emisión para muchas mezclas y se graficó la fluorescencia normalizada en función de la longitud de onda.

3.4.5.4. Estabilidad térmica de la enzima TTP0042 en LI

Con la finalidad de entender los efectos que los líquidos iónicos realizan sobre la enzima, se decidió estudiar el posible efecto estabilizante de éstos, primeramente se valoró la estabilidad térmica con el líquido [Bmim][PF₆] a 80 °C en tampón, en condiciones de reacción (30% v/v) y condiciones de saturación utilizadas en el SPR (33,5 mM ~ 0,95 % m/v). Este líquido posee la desventaja de que su anión puede hidrolizarse para generar ácido fluorhídrico al medio de reacción,²⁶⁴ por ello se evaluó la estabilidad también en otro líquido que en principio no sufre este proceso ([Bmim][FAP]).

Finalmente, debido a que los resultados de estabilidad térmica con los dos primeros líquidos utilizados no fueron los esperados, se realizó la estabilidad térmica utilizando el líquido [CPMA][MeSO₄] ya que este disolvente es soluble en agua y no tiende a hidrolizarse como ocurre con el [Bmim][PF₆]. En este ensayo se utilizaron las condiciones óptimas determinadas en el punto 3.4.3.2, las cuales incluyen: 10% m/v de líquido iónico como cosolvente, 65°C y tampón fosfato de sodio 50 mM pH 6.0. Bajo tales condiciones, la enzima tiende a realizar la síntesis del disacárido (LacNAc) con los mayores rendimientos.

La estabilidad en todos los casos se realizó colocando una disolución de 0,05 mg/mL de enzima en un baño de polietilenglicol calentado a la temperatura correspondiente (80°C para los líquidos: [Bmim][PF₆] y [Bmim][FAP] y 65°C para [CPMA][MeSO₄]. De la mezcla se toman 60 µL a ciertos intervalos de tiempo según ocurra la inactivación, y se analizó por triplicado la actividad enzimática de 10 µL en las condiciones del método

directo, descrito en el punto 3.2.4.2. La inactivación se mide en función de la actividad original de la enzima a tiempo cero y los tiempos posteriores como actividad relativa.

3.4.5.5. Estudio de interacciones por modelado molecular

Para poder dar una explicación racional de los resultados obtenidos con el SPR y los líquidos iónicos se decidió realizar un estudio de modelado molecular y docking. Este trabajo lo realizó Alvaro Cortés, doctorando de la Unidad de Bioinformática, del CBMSO.

Modelo de la proteína y ligandos:

La estructura resuelta por rayos X de la β -glucosidasa de *T. thermophilus* HB8 (PDB código 1UG6) se utilizó para definir las coordenadas iniciales. Esta proteína se diferencia de TTP0042 por un único aminoácido, presente en la mutación Y320H, para tomar en cuenta dicha mutación se modeló utilizando los modelos de CPH server.¹⁶⁸ Todos los ligandos se optimizaron geométricamente al nivel B3LYP/6-31G** de teoría con el paquete informático de “*Massively Parallel Quantum Chemistry package*”.¹⁷⁵

Docking y parametrización:

El centro activo de la enzima fue identificado como la cavidad disponible en la estructura con dos restos de ácido glutámico, Glu-164 y Glu 338-. El acoplamiento se llevó a cabo con Autodock4¹⁷³ utilizando el algoritmo genético Lamarquiano sugerido, el valor predeterminado de los parámetros y una cuadrícula de 20 Å alrededor de los dos residuos de glutámico.

Los parámetros de los ligandos se obtuvieron de PRODRG server.²⁶⁵ La estructura molecular de los líquidos [Omim][PF₆] y [Bmim][PF₆] fueron optimizadas con el sistema DFT al nivel B3LYP/6-31G**. Las longitudes de enlace, ángulos y las cargas fueron extraídos de los cálculos DFT y el resto de los parámetros se obtuvieron a partir de los parámetros del campo de fuerza. Para validar los parámetros de los disolventes, se realizaron simulaciones de 216 pares iónicos de cada uno de los ILs, para ello se crearon: 216 cationes con 216 aniones de cada especie y fueron aleatoriamente dispuestos en cajas y

se equilibrados por 300 ps a 298K y 1 bar, luego, se llevaron a cabo simulaciones de producción por 10 ns.

Tabla 7. Parámetros experimentales y teóricos de los disolventes: [Omim][PF₆] and [Bmim][PF₆].

Líquido iónico	densidad calculada (kg/m ³)	densidad experimental (kg/m ³)	ΔH_v calculada (kcal.mol ⁻¹)	ΔH_v experimental (kcal.mol ⁻¹)
[Omim][PF ₆]	1382	1368 ²⁶⁶	189	191 ²⁶⁷
[Bmim][PF ₆]	1290	1235 ²⁶⁸	261	169 ²⁶⁹

La densidad y la entalpía de vaporización y se midieron y compararon con los valores experimentales. En ambos casos los valores están de acuerdo con los datos experimentales disponibles (Tabla 7) y con los resultados de otros campos de fuerza para este tipo de molecules.²⁷⁰

Dinámica molecular:

Las simulaciones se realizaron utilizando los parámetros del campo de fuerza GROMOS 96 43a1 en el paquete de software GROMACS¹⁷⁶ v4.0.7. Los disolventes sin parámetros disponibles para el campo de fuerza y ligandos fueron parametrizada como se ha descrito antes. Todas las dinámicas moleculares y simulaciones se llevaron a cabo con el mismo protocolo. Los complejos resultantes del docking fueron solvatados en cajas de mezclas de líquidos iónicos y agua para reproducir las condiciones experimentales y cumplir con el requisito de 12 Å de cualquier átomo de la enzima y el borde de la caja.

La minimización de energía se realizó con 500 medidas de máxima pendiente seguida por 2.500 pasos de gradientes conjugados Polak-Ribiere. Luego se ejecutó una secuencia en el equilibrio de 300 ps, en condiciones de 338K y seguido de 300 ps condiciones de 338K, 1 Bar. Finalmente, se realizaron 10 ns de simulaciones y se analizaron mediante análisis de componentes principales (PCA).²⁷¹

3.4.6. Síntesis de disacáridos con la enzima TTP0042 inmovilizada

Se procedió a inmovilizar la enzima TTP0042 para evaluar su uso en la síntesis del disacárido (LacNAc). De todas las enzimas caracterizadas y evaluadas previamente, esta es la que mayor actividad presenta y dada su forma de producción resulta factible producirla a fin de estudiar la inmovilización de la misma. No se inmovilizó la enzima de Biolacta, ya que este trabajo fue realizado en la tesis doctoral de Antonio Aires (actualmente en preparación). Las inmovilizaciones se realizaron sobre Eupergit CM y polímeros macroporosos elaborados por Antonio Aires, también se realizó la inmovilización sobre glioxil agarosas y por entrecruzamiento con glutaraldehído (CLEA's), los procedimientos generales de inmovilización fueron los siguientes:

3.4.6.1. Síntesis de disacáridos con la β -galactosidasa TTP0042 sobre soportes macroporosos

Se utilizaron los soportes macroporosos sintetizados por Antonio Aires. Las características de los monómeros utilizados en la síntesis de tales polímeros y su caracterización se presentan respectivamente en la figura 19 y tabla 8. Su naturaleza es en general poco hidrofílica aunque su funcionalización ha buscado ser más compatible con medios acuosos que otros polímeros como el Eupergit CM, a fin de ser biocompatibles con la naturaleza de moléculas como las proteínas. En este estudio se ha utilizado también el Eupergit como soporte comercial para comparar los resultados con la enzima inmovilizada sobre soportes macroporosos no comerciales.

Inmovilización de TTP0042 sobre soporte macroporosos

Para la inmovilización de las enzimas en estos soportes, se colocó 0,1 mg de proteína en un tubo Eppendorf de 2 mL junto con 10 mg de soporte y 1,5 mL de tampón fosfato de sodio 50 mM pH 7.00 500 mM NaCl. La mezcla se dejó en contacto a temperatura ambiente durante 24 horas a 25 rpm. Pasado este tiempo se cuantifica por método Bradford la proteína residual en el líquido supernatante y se calcula la cantidad de enzima anclada al soporte. Se filtra la mezcla y el polímero se deja en contacto con glicina 3M pH 8,50 durante 16 horas a 25 rpm. Pasado este tiempo se lava el polímero con agua destilada y se liofiliza, finalmente se conserva de 4-8 °C.

Actividad hidrolítica de la enzima TTP0042 inmovilizada

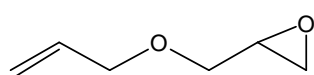
La actividad hidrolítica de la enzima inmovilizada, se realizó por el método directo (Punto 3.2.4.2.). Utilizando una masa de 3 mg de enzima inmovilizada en soportes macroporosos. En el caso de la enzima inmovilizada sobre glioxil agarosas y en CLEA's se utilizaron cantidades mucho más pequeñas de enzima, debido a los altos niveles de actividad retenida en el derivado inmovilizado (20 µL de suspensión del biocatalizador inmovilizado, con concentración de 100 mg de derivado inmovilizado por mililitro, pH 7,00, 50 mM tampón fosfato de sodio.)

Estudio de inmovilización de TTP0042 sobre soportes macroporosos

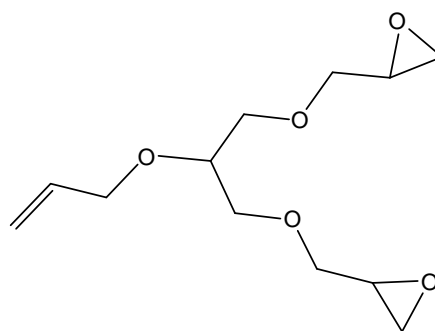
Debido a los bajos rendimientos de actividad enzimática (aunque altos niveles de inmovilización) de la enzima TTP0042 sobre soportes macroporosos, se consideró que habrían dos factores que pudiesen afectar la inmovilización: I) El uso de la glicina en la enzima inmovilizada, II) La liofilización. Por ello, se evaluó posteriormente, su efecto realizando la inmovilización en ausencia de cada uno de éstos factores. Primeramente se seleccionó el polímero 146K debido a que es uno de los polímeros con mejores resultados de actividad retenida con la enzima TTP0042 y se realizó la inmovilización con y sin liofilizar, sin mejoras visibles. Sin embargo, se decidió no utilizar más la liofilización, en su lugar las enzimas fueron secadas sobre papel adsorbente.

Síntesis enzimática de disacáridos utilizando TTP0042 inmovilizada sobre soportes macroporosos

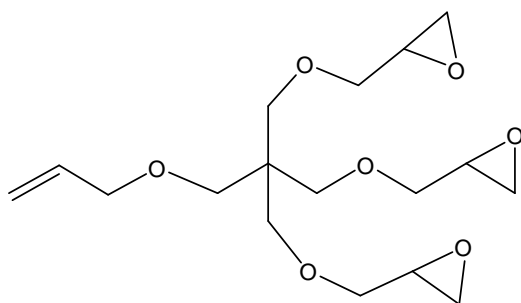
Pese a la baja actividad hidrolítica reportada por la enzima inmovilizada, se decidió inmovilizar suficiente enzima como para dar paso a una reacción de transglicosidación. Las condiciones de reacción fueron: 0,17 M de pNF-β-Gal como donador y 0,85M de GlcNAc como aceptor, en tampón fosfato de sodio 50 mM pH 6,0. Se utilizaron 0,200 mg de enzima inmovilizada sobre el soporte 146K con una actividad aproximada de 165 U/mg de enzima inmovilizada.



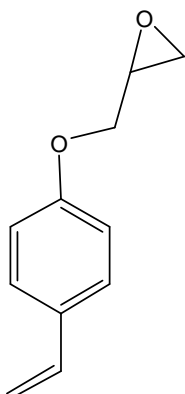
Alil glicidil éter



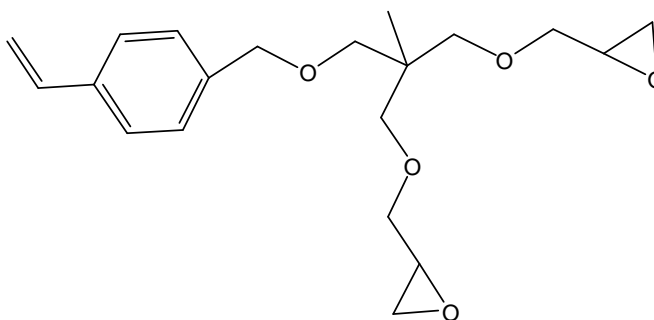
2- alil-1,3-diglicil glicerol éter ADGGE



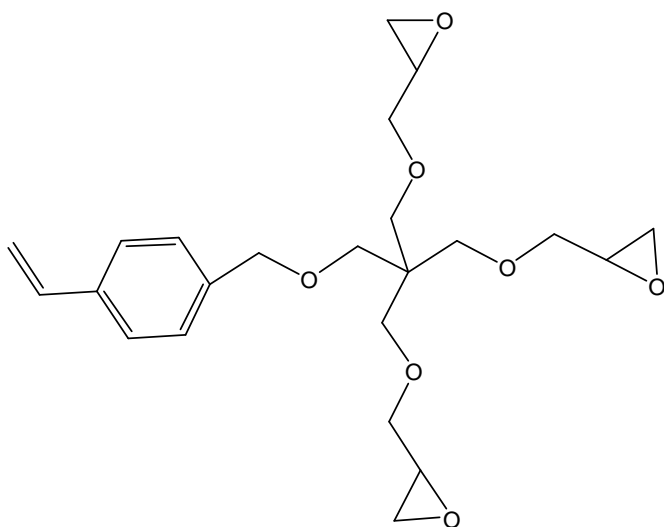
Alil triglicil pentaeritritol éter (ATGPE)



p-glicidil estireno



p-{ {2,2-bis [(glicidiloxi) metil] propanoxi} metil } estireno (GMPME)



p-[(triglicidil pentaeritritoxi) metil] estireno (TGPME)

Figura 19. Estructura de los monómeros de partida utilizados en la síntesis de los polímeros funcionalizados con grupos Epóxidos sintetizados por A. Aires. (continúa en la página siguiente).

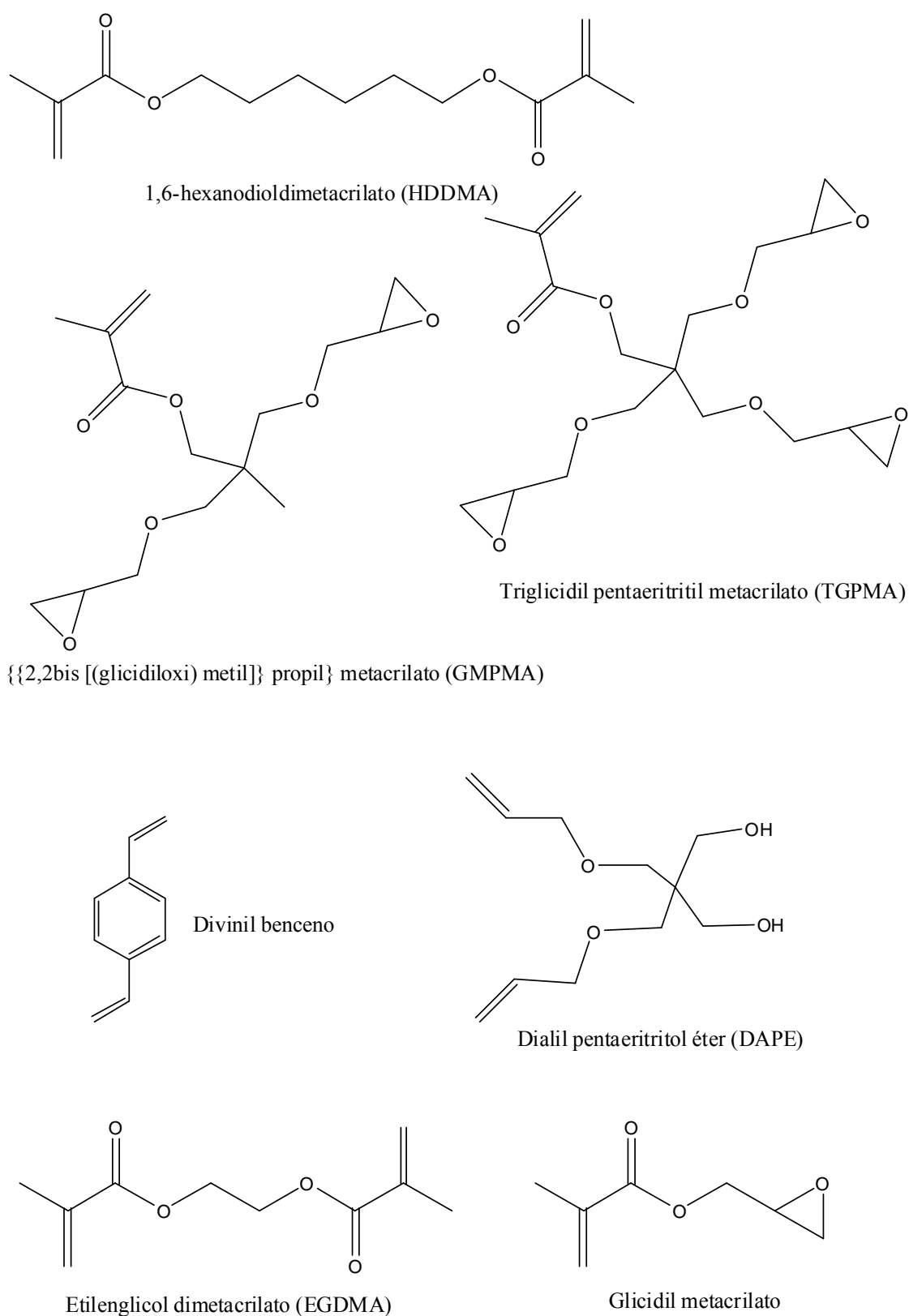


Figura 19. Estructura de los monómeros de partida utilizados en la síntesis de los polímeros funcionalizados con grupos Epóxidos sintetizados por A. Aires.

Tabla 8. Composición de los polímeros macroporosos utilizados en el presente trabajo. (Fuente: A. Aires)

Copolímero	Equivalencia	Tamaño de poro (nm)	Superficie específica BET (m ² /g)
Poli(AGE- <i>co</i> -DVB)-100	A122B	24,9	96,9
Poli(ADGGE- <i>co</i> -DVB)-50	A83H	26,1	242,1
Poli(ATGPE- <i>co</i> -DVB)-13	A107M	24,2	207,7
Poli(AGE- <i>co</i> -DAPE-DVB)-31	A116A	19,9	333,1
Poli(ADGGE- <i>co</i> -DAPE-DVB)-19	A103G	18,9	191,0
Poli(ATGPE- <i>co</i> -DAPE-DVB)-9	A112I	21,8	280,4
Poli(GE- <i>co</i> -DVB)-4	A67B	24,1	73,9
Poli(BGMPME- <i>co</i> -DVB)-5	A143E	21,6	64,0
Poli(TGPME- <i>co</i> -DVB)-3	A133A	22,9	39,4
Poli(GMA- <i>co</i> -EGDMA)-12	A146K	25,4	45,4
Poli(GMA- <i>co</i> -HDDMA)-2	A168B	26,4	27,0
Poli(BGMPMA- <i>co</i> -EGDMA)-8	A175H	30,4	44,8
Poli(TGPMA- <i>co</i> -EGDMA)-9	A172I	26,8	44,1
Poli(GMA-HEMA- <i>co</i> -EGDMA)-9	A153A	27,1	33,8
Poli(BGMPMA-HEMA- <i>co</i> -EGDMA)-2	A179B	24,9	21,5
Poli(TGPMA-HEMA- <i>co</i> -EGDMA)-1	A176A	24,8	33,1
Poli(GMA-DEAEMA- <i>co</i> -EGDMA)-1	A152A	31,4	37,8
Poli(BGMPMA-DEAEMA- <i>co</i> -EGDMA)-1	A180A	21,9	17,2
Poli(TGPMA-DEAEMA- <i>co</i> -EGDMA)-1	A177A	23,2	16,8
Poli(GMA-HEMA-DEAEMA- <i>co</i> -EGDMA)-9	A157I	27,6	51,2
Poli(BGMPMA-HEMA-DEAEMA- <i>co</i> -EGDMA)-2	A181A	30,6	2,6
Poli(TGPMA-HEMA-DEAEMA- <i>co</i> -EGDMA)-1	A178A	22,6	53,4
Poli(GMA-AGE- <i>co</i> -EGDMA)-18	A162R	21,95	135,58
Poli(GMA-AGE- <i>co</i> -EGDMA-DVB)-12	A163L	21,33	141,98

3.4.6.2. Estrategias de inmovilización sobre soportes macroporosos con TTP0042

Dada la baja actividad hidrolítica de la enzima inmovilizada, se analizó la distribución de lisinas de la enzima TTP0042 tomando como base la estructura cristalizada de la β -glucosidasa de *T. thermophilus* HB8 (PDB 1UG6) que tan solo difiere en un aminoácido de toda la secuencia, resultando que todas las lisinas (5 en total) están detrás del centro activo, es decir, la inmovilización por lisinas no tocaría el centro activo ni sus cercanías. Entonces se valoró la ubicación de las cisteínas, aminoácidos que no son abundantes en las enzimas termófilas debido a su reactividad, pero que serían susceptibles a reaccionar con los epóxidos. El resultado indicó que existen dos cisteínas, una de ellas: Cys-167 muy cerca del centro activo de la enzima.

Thermus thermophilus HB27	NEPWCSAFLGH
Thermus thermophilus Hb8	NEPWCSAFLGH
Thermus nonproteolyticus	NEPWCSAFLGH
Streptomyces sp	NEPWCSAFLGY
Thermotoga maritima	NEPWVVAIVGH
Bacillus circulans subsp alkal	NEPWCMAFLSN
Clostridium cellulovorans	NEPWVASYLGY
Oryza sativa Japonica Group	NEPRIVALLGY
Trifolium repens	NEPWGVSMNAY
Trichoderma reesei	NEPICSAIPGY
Phanerochaete chrysosporium	NEPWVISVMGY
Pyrococcus horikoshii	NEPMVYVMMGY
Thermosphaera aggregans	NEPNVVEQGY
Sulfolobus solfataricus	NEPNVVGGLGY
Clustal Consensus	*** .

Figura 20. Alineamiento BLAST del centro activo de la enzima TTP0042 respecto a otras enzimas con gran similitud estructural. En muchos casos la valina sustituye a la cisteína.

Por lo anterior, se diseñaron dos mutantes de la enzima TTP0042 mutando la cisteína 167 y colocando en su lugar un aminoácido hidroxilado similar: la serina. Además se analizaron las homologías de otras enzimas de similitud estructural y fisiológica, mediante análisis BLAST,¹⁵⁹ donde se encontraron dominios muy conservados en el entorno del centro activo de la enzima (Figura 20). De esta homología se determinó que la valina sería un sustituto equivalente de la cisteína en otras especies, por lo tanto se realizó la mutagénesis cambiando la cisteína por valina, además se colocó el mismo grupo extensor de histidinas para facilitar su purificación. Este trabajo fue realizado por el doctorando Carlos Bayón en el laboratorio del Prof. Dr. Berenguer y con la colaboración del Dr. Aurelio Hidalgo. La evaluación de la actividad hidrolítica y sintética de estos mutantes fue realizada por el estudiante Sergio Navarrete como parte de su beca de colaboración.

Estudio de inmovilización con las enzimas mutantes

Se purificaron y evaluaron las actividades hidrolíticas de las enzimas libres C167V y C167S en las mismas condiciones que la enzima original. Una vez determinada su actividad, se inmovilizaron sobre soportes macroporosos, siguiendo el protocolo original de inmovilización.

Inmovilización con agentes de bloqueo del centro activo

Dada la baja actividad hidrolítica que presentaron los dos mutantes (sin inmovilizar) se evaluó la actividad de inhibidores competitivos de la enzima original, como galactosa y lactosa, para bloquear el centro activo de la enzima y con ello evitar distorsiones por anclaje del soporte con la cisteína 167 de la enzima.

Este trabajo se basa en el principio de que las enzimas pueden sufrir inhibición competitiva por moléculas que impiden el acceso al centro activo, de esta manera, el uso de sustratos como galactosa o lactosa podría dar lugar a una inhibición de este tipo evitando que la cisteína 167 reaccione con los grupos epóxido y con ello proteger la cisteína 167. Para evaluar esta posibilidad se seleccionaron los tres polímeros que mejor resultado dieron en la primera inmovilización: 146K, 162R y 159D. También se decidió realizar la inmovilización con glicina y sin glicina para evaluar el efecto de este proceso.

Determinación de inhibidores enzimáticos de la TTP0042

Se seleccionaron como potenciales inhibidores galactosa y lactosa por su afinidad al centro activo de una β -galactosidasa. Se realizó la cuantificación de actividad enzimática de TTP0042 como enzima libre (descrita en el punto 3.2.4.2) en una cubeta de cuarzo con p NF- β -Gal como sustrato de hidrólisis (5mM, pH 7,0, tampón fosfato de sodio 50 mM) y con las siguientes concentraciones de sustrato inhibidor: 0 %, 0,5 %, 1,0 %, 2,5 %, 5 %, 10 % y 15 %. Se representó la información obtenida como el inverso de la velocidad enzimática en función de la concentración de inhibidor.

Inmovilización sobre soportes macroporosos en presencia de inhibidores competitivos

Una vez comprobada la naturaleza inhibidora de ambos azúcares, se decidió realizar la inmovilización de la enzima TTP0042 sobre soportes macroporosos en presencia, manteniendo la relación soporte enzima igual que en la primera inmovilización (10 mg de enzima por cada gramo de soporte), y usando como medio de inmovilización el mismo tampón (fosfato de sodio 50 mM, 500 mM de NaCl pH 7.0) y un 2.5% m/v de galactosa o lactosa, según fuera el caso. La inmovilización se realizó con glicina y sin glicina, para mostrar el efecto de este agente de bloqueo de los soportes sobre el derivado inmovilizado final.

3.4.6.3. Inmovilización de la enzima TTP0042 sobre glioxil agarosas

Se utilizaron cuatro distintas aproximaciones para inmovilizar la enzima TTP042 sobre soportes de agarosa entrecruzada. Éstos soportes han sido diseñados para orientar la inmovilización en función de los grupos funcionales de la enzima, por lo que con un adecuado conocimiento de la estructura tridimensional de la enzima se puede orientar la unión proteína-soporte utilizando uno de los soportes funcionalizados. Los soportes utilizados son:

- I) Soporte tradicional de glioxil agarosa ²²⁰
- II) Soporte de glioxil agarosa con níquel quelatado (IDA-Ni²⁺) ²²²
- III) Soporte de glioxil agarosa con ácido iminodiacético sin quelatar (aniónico) ²²²
- IV) soporte de glioxil agarosa con amonio cuaternario (catiónico) ²²²

Glioxil agarosa tradicional:

La inmovilización se realizó colocando 0,10 mg de enzima (165 U/mg) la disolución se diluyó con tampón bicarbonato de sodio 100 mM pH 10,50 hasta un volumen final de 3,0 mL y el pH final de la disolución se ajustó hasta 10,05. Luego se añaden 100 mg de soporte (agarosa entrecruzada al 10%). La mezcla se dejó agitando en condiciones suaves durante un mínimo de cuatro horas. De la mezcla se tomaron 10 µL a diferentes tiempos de inmovilización y se filtraron para medir la actividad de enzima sin inmovilizar en el líquido sobrenadante. Cuando se completó el proceso de inmovilización se adicionó 1 mg de

borohidruro de sodio (NaBH_4) por cada mililitro de disolución, la mezcla se agitó magnéticamente y sin tapar durante 30 minutos para reducir el enlace imina. La mezcla final se filtró sobre un plato poroso y se lavó con agua destilada. El derivado inmovilizado se guardó de 2°C-8°C.

Glioxil agarosa IDA- Ni^{2+} :

Se colocó 0,10 mg de enzima (165 U/mg), utilizando un tampón fosfato pH 7,00 50 mM, la mezcla se dejó en agitación suave durante cuatro horas. Se tomaron alícuotas de 10 μL a diferentes tiempos de inmovilización y se filtraron para medir la actividad de enzima sin inmovilizar en el líquido sobrenadante. Cuando la actividad enzimática del sobrenadante fue nula, se filtró el soporte sobre un plato poroso y se resuspendió a pH 10.05 con tampón bicarbonato de sodio 100 mM toda la noche. Posteriormente la mezcla se trató con NaBH_4 igual que en el caso anterior, se filtró sobre un plato poroso y se lavó con agua destilada. El derivado inmovilizado se guardó de 2 °C-8 °C.

Glioxil agarosa aniónico:

Se colocó 0,10 mg de enzima (165 U/mg), utilizando un tampón fosfato pH 7,00, 5mM, para evitar interacciones inespecíficas salvo la atracción entre los grupos amino protonados de la enzima y las cargas negativas del soporte, la mezcla se dejó en agitación suave por cuatro horas para que la enzima y el soporte se acercaran. Se tomaron alícuotas de 10 μL a diferentes tiempos de inmovilización y se filtraron para medir la actividad de enzima sin inmovilizar en el líquido sobrenadante. Cuando la actividad enzimática del sobrenadante fue nula, se filtró el soporte sobre un plato poroso y se dejó a pH 10.05 con tampón bicarbonato de sodio 100 mM toda la noche. Luego de ello la mezcla se redujo con NaBH_4 igual que en el caso anterior, se filtró sobre un plato poroso y se lavó con agua destilada. El derivado inmovilizado se guardó de 2°C-8°C.

Glioxil agarosa catiónico:

El proceso realizado fue exactamente igual que el proceso de inmovilización enzima-soporte aniónico, en este caso la atracción ocurre entre los grupos carboxilato de la enzima y las cargas positivas del soporte. El derivado inmovilizado se guardó de 2°C-8°C.

3.4.6.4. Caracterización de TTP0042 inmovilizada sobre agarosas

Dados los altos rendimientos de inmovilización sobre agarosas, se decidió realizar la caracterización de la enzima sobre este soporte. Para este trabajo se seleccionó la agarosa tradicional (GX), dado que fue el soporte mejor inmovilizó la enzima TTP0042.

Efecto de carga:

El efecto de la proteína cargada en los soportes se evaluó, utilizando diferentes cantidades de enzima cargados por masa de soporte, las concentraciones utilizadas en la inmovilización fueron: 5, 10, 20, 30, 40 y 50 mg enzima/ gramo de soporte. Se determinó la proteína inmovilizada y su actividad en el soporte.

pH óptimo:

El efecto del pH sobre la enzima libre e inmovilizada fue estudiado analizando la actividad hidrolítica a distintos valores de pH por el método indirecto (ver punto 3.2.4.2.), ya que la adición de carbonato de sodio permite medir todo el *p*NP liberado y de esta forma se evitan los contratiempos debidos a la ionización dependiente del pH que tiene dicho sustrato.

En este caso, se añadieron 850 μ L de tampón fosfato de sodio (50 mM) y 100 μ L de *p*NP- β -Gal (50 mM disuelto en agua destilada) se mezclaron en un tubo reactor y se incubaron a 60 °C durante 1 minuto. Posteriormente se añadieron 50 μ L de solución de enzima libre o suspensión de derivado inmovilizado a la mezcla de reacción. Tras 10 minutos, la reacción se detuvo mediante la adición de 2 mL de carbonato de sodio 1 M, las diluciones posteriores de esta muestra se realizaron con esta misma disolución. La actividad relativa se determinó por absorbancia de las muestras a 410 nm contra una recta de calibrado de *p*NP disuelto en carbonato de sodio 1 M (punto 3.2.4.1). Este ensayo lo realizó Sergio Navarrete como parte de su beca de colaboración.

Estabilidad térmica:

Los ensayos de estabilidad térmica se realizaron a 70°C, 80°C y 90°C en un medio acuoso (50 mM de sodio fosfato de pH 6,00) utilizando la misma cantidad de β -galactosidasa libre

e inmovilizada en soporte sólido (0,05 mg de enzima activa /mL muestra). En función de la velocidad de inactivación, se retiraron de forma periódica muestras de disolución (enzima libre) o suspensión (enzima inmovilizada) y se midió su actividad hidrolítica por el método directo.

Temperatura óptima de transglicosilación:

Se decidió evaluar la temperatura óptima de transglicosilación con la enzima inmovilizada y con la enzima libre. Para ello la reacción de transglicosilación se realizó a diferentes temperaturas: 30 °C, 40 °C, 50 °C, 60 °C, 70 °C y 80 °C. Las condiciones de reacción fueron: 0,17M de *p*NF- β -Gal como donador y 0,85 M de GlcNAc como aceptor, en tampón fosfato de sodio 50 mM pH 6,0. Se utilizaron 0,2 mg de enzima libre e inmovilizada con una actividad aproximada de 165 U/mg de enzima.

Ciclos de reutilización:

Se establecieron como condiciones de reacción 36 $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}$ de enzima inmovilizada, 0,17 M de *p*NF- β -Gal y 0,85 M de GlcNAc, disueltos en 1,0 mL de tampón fosfato de sodio 50 mM pH 6,0. Se utilizó agitación orbital moderada, ya que la agitación magnética tiende a dañar la agarosa para reusos posteriores. Se seleccionó la mejor temperatura de transglicosilación determinada en el procedimiento anterior (60 °C). Después de 60 minutos, la mezcla de reacción se centrifugó a (14000 rpm, 4 minutos, temperatura ambiente). Se separó el líquido sobrenadante y la enzima se lavó dos veces con agua destilada y luego con tampón fosfato de sodio 50 mM pH 6,0. El sobrenadante de cada reuso se analizó por HPLC-ELSD. La enzima inmovilizada se secó sobre papel absorbente y se pesó para la reutilización siguiente. Las cantidades de reactivos para reutilizaciones consecutivas se calcularon como función de la masa recuperada de catalizador, manteniendo constante la relación de 36U enzimáticas por mL de medio de reacción. Finalmente, se realizó la reutilización de este derivado en presencia de un 10% m/v de líquido iónico [CPMA][MeSO₄], ya que se determinó que la enzima resultaba compatible en dicho medio y aumentaba la síntesis de Gal- β (1 \rightarrow 4)-GlcNAc (Ver punto 3.4.3.2).

Transglicosilación con TTP42-GX en presencia de líquidos iónicos:

La transglicosilación se repitió, siguiendo las condiciones del punto 3.4.3.2. con la enzima libre e inmovilizada. Debido a los resultados obtenidos, se seleccionaron los siguientes líquidos iónicos como cosolventes (30% v/v): [Bmim][PF₆], [Emim][BF₄] y [Bmim] [FAP]

3.4.6.5. Inmovilización de la enzima TTP0042 en forma de CLEA's

Con la ayuda de Ulrike Langerwisch (estudiante de Máster de la Universidad de Lübeck, Alemania) se evaluaron cuatro formas de elaboración de CLEA's con la enzima TTP0042, utilizando como agentes agregantes: polietilenimina (PEI), dimetoxietano (DME) y sulfato de amonio ((NH₄)₂SO₄ disolución acuosa saturada). Para ello se enfriaron en un baño con hielo y por aparte cada uno de los agentes agregantes y la disolución de enzima. Las cantidades utilizadas aparecen en la Tabla 9.

La mezcla agregada se dejó reposar durante 30 minutos para dar paso a los agregados de proteínas. Una vez finalizada la agregación se añadió glutaraldehído (grado reactivo disolución acuosa 25% v/v). Se tomaron alícuotas de 10 µL a diferentes tiempos de inmovilización y se filtraron para medir la actividad de enzima sin inmovilizar en el líquido sobrenadante. Cuando finalizó la mezcla, se centrifugó a 14000 rpm durante 5 minutos y se resuspendió la mezcla en 1 mL, así mismo se agitó la suspensión y se midió la actividad enzimática de la mezcla para medir la actividad de la enzima en forma de CLEA's.

Tabla 9. Cantidades de reactivos y enzima, utilizadas para producir CLEA's de TTP0042.

Ensayo	µL glutaraldehído (25% v/v)	µL agregante	µL Enzima (1 mg/mL)
DME 1	20	240	100
DME 2	20	120	100
PEI	20	120	100
(NH₄)₂SO₄ saturado	20	120	100

Reacciones de transglicosilación con CLEA's de TTP0042

Dada la buena actividad enzimática retenida por el CLEA sintetizado con DME (2) se decidió inmovilizar suficiente enzima para realizar una reacción de transglicosilación con la enzima inmovilizada. Las condiciones de reacción fueron las mismas que las utilizadas con la enzima GX-TTP0042 en condiciones óptimas (3.4.6.4): 60°C, 0,17M de *p*NF-β-Gal como donador y 0,85 M de GlcNAc como aceptor, en tampón fosfato de sodio 50 mM pH 6,0. Se utilizaron 0,2 mg de enzima libre e inmovilizada con una actividad de 165 U/mg de enzima.

3.5. SÍNTESIS DE GLICOCONJUGADOS CON LIPASAS

Para el presente trabajo se caracterizaron tres lipasas: dos lipasas comerciales, procedentes de *C. antarctica*, la lipasa no purificada (CAL) y la lipasa B (CAL-B) de este organismo, recombinante en *A. oryzae* y la lipasa de *R. oryzae* recombinante en *P. pastoris* (ROL), las lipasas se caracterizaron, se inmovilizaron y se evaluaron como posibles catalizadores en la síntesis de glicoconjugados.

3.5.1. Caracterización de lipasas

Como caracterización de las lipasas estudiadas se realizaron tres procedimientos básicos: determinación del contenido proteico del sólido, actividad enzimática (hidrólisis) frente a sustratos acilados y perfil de elución en electroforesis desnaturante (SDS-PAGE).

3.5.1.1. Contenido proteico:

Se calculó el porcentaje de proteínas presente en el sólido comercial de CAL y CAL-B, disolviendo una masa de 10 mg de sólido en tampón fosfato de sodio 50 mM pH 7,00. La disolución se homogenizó y se analizó por el método Bradford.²⁵¹ Se realizó un blanco con fosfato de sodio 50 mM pH 7,0 y se cuantificó la cantidad de proteínas en la disolución contra una recta de calibrado de BSA.

3.5.1.2. Actividad enzimática:

La actividad enzimática se midió por hidrólisis de *p*-nitrofenil palmitato (*p*NFP) a 37°C, para ello se añadieron 2250 µL de tampón fosfato de sodio 50 mM pH 7.00 en una cubeta de cuarzo que se atempera en el espectrofotómetro con agitación magnética a 37°C. Se adicionaron 250 µL de *p*-nitrofenil palmitato (*p*NFP) 10 mM disuelto en 2-propanol (de esta forma la concentración final de *p*NFP será de 1,0 mM). La hidrólisis da inicio por adición de 10 µL de disolución enzimática. Se midió el incremento de absorbancia por 3 minutos a 410 nm y se cuantificó el *p*-nitrofenol (*p*NF) liberado en el ensayo por medio de una recta de calibrado desarrollada en las mismas condiciones (pH 7.0, 10% 2-propanol, ver figura 21). Se define una unidad enzimática (U) como la cantidad de enzima que libera un micromol de *p*NF por minuto. Se calcula la actividad en U/gramo de soporte y U/mg enzima inmovilizada. También se valoró la actividad hidrolítica en función de las cadenas de ácidos grasos, utilizando: *p*-nitrofenil butirato (*p*NFB) y *p*-nitrofenil acetato (*p*NFAc) en las mismas condiciones que el *p*NFP.

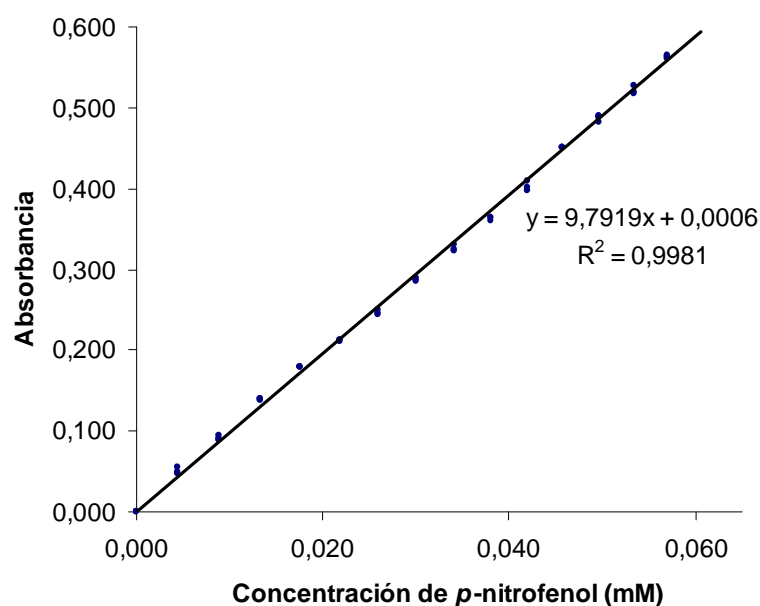


Figura 21. Recta de calibrado de *p*-nitrofenol, a pH 7,00 en tampón fosfato de sodio 50 mM con 10% de 2-propanol.

3.5.1.3. Electroforesis (SDS-PAGE):

Se prepararon disoluciones de 1,4 mg/mL de lipasa y se diluyeron a 0,7 mg/mL con tampón de carga para electroforesis desnaturalizante. Se realizó la electroforesis cargando 10 μ L de muestra (7,0 μ g de enzima) en geles de acrilamida por la técnica descrita en procedimientos generales (punto 3.2.2.2)

3.5.2. Reacciones de acilación de azúcares con lipasas libres

Se evaluaron varias aproximaciones de acilación de azúcares utilizando lipasas, siendo uno de los mayores problemas compatibilizar la solubilidad del azúcar con el medio de reacción para la lipasa, ya que las lipasas suelen desempeñarse mejor en medios poco polares y los azúcares se tienden a disolver en medios muy polares. Se probaron distintas aproximaciones con lipasas libres para obtener derivados acilados de azúcares, modificando la relación aceptor (azúcar): donador (éster vinílico del ácido graso), disolventes y tiempos de reacción.

3.5.2.1. Reacciones en tetrahidrofurano y 2-metiltetrahidrofurano:

El tetrahidrofurano (THF) es un disolvente poco sostenible, en tanto que el metiltetrahidrofurano (Me-THF), se decidió comparar ambos disolventes como medio de reacción asumiendo que su polaridad es compatible en parte con los sustratos y en parte con los productos. La relación molar donador:aceptor fue 5:1. Se colocaron 30 mg *p*NF- β -Gal (0.10 mmol) en un tubo de reacción y se añadieron las cantidades equivalentes a 0.50 mmol de agente acilante (butirato de vinilo, laurato de vinilo y esterato de vinilo). La mezcla resultante se suspendió en 1,0 mL de disolvente y se añadió un 10% m/v de tamiz molecular (3A^o) para eliminar el agua del medio y evitar las reacciones de hidrólisis. Se utilizaron como disolventes el THF y el Me-THF, la mezcla resultante se atemperó a 40 °C y se agitó a 220 rpm por agitación magnética. Se añadieron 10 mg de CAL-B (se coloca menos cantidad de CAL-B por que es un sólido con mayor actividad enzimática que la CAL) durante 24 horas. Se tomaron alícuotas de 100 μ L a las 0, 24, 48 y 72 horas de reacción para analizar su composición por HPLC (ver punto 3.5.1.5). Dado que la mezcla perdía volumen por la evaporación del disolvente, se añadieron 500 μ L más de Me-THF u

800 μL de THF cada 24 horas para compensar las pérdidas de volumen. Las cantidades de reactivos y disolventes utilizados en este caso aparecen en la Tabla 10.

Tabla 10. Condiciones de reacción para la acilación de $p\text{NF-}\beta\text{-Gal}$ en THF y Me-THF.

Ensayo	Enzima	Disolvente	Donador	Aceptor	Disolvente
1	10 mg CAL-B	THF	30 mg $p\text{NF-}\beta\text{-Gal}$	65 μL Butirato de vinilo	1 mL THF
2	10 mg CAL-B	THF	30 mg $p\text{NF-}\beta\text{-Gal}$	130 μL Laurato de vinilo	1 mL THF
3	10 mg CAL-B	THF	30 mg $p\text{NF-}\beta\text{-Gal}$	180 μL Esterato de vinilo	1 mL THF
4	10 mg CAL-B	Me-THF	30 mg $p\text{NF-}\beta\text{-Gal}$	65 μL Butirato de vinilo	1 mL THF
5	10 mg CAL-B	Me-THF	30 mg $p\text{NF-}\beta\text{-Gal}$	130 μL Laurato de vinilo	1 mL THF
6	10 mg CAL-B	Me-THF	30 mg $p\text{NF-}\beta\text{-Gal}$	180 μL Esterato de vinilo	1 mL THF

Las reacciones se repitieron con las enzimas CAL y ROL, usando una cadena más grande de ácido graso: el laurato de vinilo, debido a que el butirato de vinilo no pareció ser reconocido para la acilación sino para la hidrólisis del mismo. Y en la literatura este sustrato parece ser fácilmente reconocido por la lipasa.^{173, 175} Las nuevas reacciones fueron las mostradas en la Tabla 11.

Tabla 11. Condiciones de reacción para la acilación de $p\text{NF-}\beta\text{-Gal}$ en THF y Me-THF.

Ensayo	Enzima	Donador	Aceptor	Disolvente
1	10 mg ROL	30 mg $p\text{NF-}\beta\text{-Gal}$	130 μL Laurato de vinilo	1 mL THF
2	10 mg ROL	30 mg $p\text{NF-}\beta\text{-Gal}$	130 μL Laurato de vinilo	1 mL MeTHF
3	15 mg CAL*	30 mg $p\text{NF-}\beta\text{-Gal}$	130 μL Laurato de vinilo	1 mL THF
4	15 mg CAL*	30 mg $p\text{NF-}\beta\text{-Gal}$	130 μL Laurato de vinilo	1 mL MeTHF

* Se colocan 15 mg de CAL por que su actividad es mucho menor a la de CAL-B.

3.5.2.2. Reacciones en *Terc*-butanol y líquidos iónicos:

Algunas referencias sobre la acilación de azúcares utilizando lipasas postulan el *terc*-butanol (T-BuOH) como un disolvente compatible con las lipasas y los sustratos. En ciertos casos se utilizan líquidos iónicos como cosolventes.^{97, 101} Por ese motivo se decidió usar esta aproximación, ya que los resultados obtenidos con THF y Me-THF no fueron exitosos. En este nuevo intento se cambió la relación donador: aceptor a 1:1 con un pequeño déficit de donador (95% de donador) para evitar posibles di-acilaciones observadas en el primer intento y atribuidas a un exceso de donador. También se redujo el tiempo de reacción a 24 h para evitar múltiples acilaciones. Las condiciones de reacción se describen en detalle en la tabla 12.

Tabla 12. Condiciones de reacción para la acilación de *p*NF- β -Gal en T-BuOH.

Ensayo	Enzima	Donador	Aceptor	Disolvente
1	10 mg CAL-B	30 mg <i>p</i> NF- β -Gal	12 μ L Butirato de vinilo	1 mL T-BuOH
2	10 mg CAL-B	30 mg <i>p</i> NF- β -Gal	24 μ L Laurato de vinilo	1 mL T-BuOH
3	10 mg CAL-B	30 mg <i>p</i> NF- β -Gal	34 μ L Esterato de vinilo	1 mL T-BuOH
4	15 mg CAL*	30 mg <i>p</i> NF- β -Gal	12 μ L Butirato de vinilo	1 mL T-BuOH
5	15 mg CAL*	30 mg <i>p</i> NF- β -Gal	24 μ L Laurato de vinilo	1 mL T-BuOH
6	15 mg CAL*	30 mg <i>p</i> NF- β -Gal	34 μ L Esterato de vinilo	1 mL T-BuOH
7	10 mg ROL	30 mg <i>p</i> NF- β -Gal	12 μ L Butirato de vinilo	1 mL T-BuOH
8	10 mg ROL	30 mg <i>p</i> NF- β -Gal	24 μ L Laurato de vinilo	1 mL T-BuOH
9	10 mg ROL	30 mg <i>p</i> NF- β -Gal	34 μ L Esterato de vinilo	1 mL T-BuOH

* Se colocan 15 mg de CAL por que su actividad es mucho menor a la de CAL-B.

Se realizó una aproximación más diluida con T-BuOH y un 10% de líquidos iónicos (sistema bifásico) utilizando el líquido [Bmim][PF₆]. En esta ocasión se utilizó otro aceptor: GlcNAc, con la finalidad de analizar si los bajos rendimientos obtenidos en las ocasiones anteriores se han debido a la naturaleza del primer aceptor (*p*NF-β-Gal). Las condiciones de reacción aparecen mostradas en la tabla 13

Tabla 13. Reacciones de acilación de azúcares

Ensayo	Enzima	Donador	Aceptor	Disolvente	Cosolvente
1	10 mg CAL-B	23,3 mg GlcNAc	12 µL Butirato de vinilo	1 mL T-BuOH	10% [Bmim][PF ₆]
2	10 mg CAL-B	23,3 mg GlcNAc	24 µL Laurato de vinilo	1 mL T-BuOH	10% [Bmim][PF ₆]
3	10 mg CAL-B	23,3 mg GlcNAc	34 µL Esterato de vinilo	1 mL T-BuOH	10% [Bmim][PF ₆]
4	15 mg CAL*	23,3 mg GlcNAc	12 µL Butirato de vinilo	1 mL T-BuOH	10% [Bmim][PF ₆]
5	15 mg CAL*	23,3 mg GlcNAc	24 µL Laurato de vinilo	1 mL T-BuOH	10% [Bmim][PF ₆]
6	15 mg CAL*	23,3 mg GlcNAc	34 µL Esterato de vinilo	1 mL T-BuOH	10% [Bmim][PF ₆]
7	10 mg ROL	23,3 mg GlcNAc	12 µL Butirato de vinilo	1 mL T-BuOH	10% [Bmim][PF ₆]
8	10 mg ROL	23,3 mg GlcNAc	24 µL Laurato de vinilo	1 mL T-BuOH	10% [Bmim][PF ₆]
9	10 mg ROL	23,3 mg GlcNAc	34 µL Esterato de vinilo	1 mL T-BuOH	10% [Bmim][PF ₆]

3.5.2.3. Análisis por HPLC:

Las alícuotas se diluyen con 9 volúmenes de THF y se conservan a -20°C en tubos de vidrio, ya que el THF tiende a disolver (lentamente) los tubos Ependorf. Las muestras se filtran a temperatura ambiente utilizando un poro de 0.2 µm y se analizan por HPLC (ver punto 3.1.4.3) siguiendo las indicaciones de la bibliografía de referencia:⁹⁷ columna ODS

Hypersyl 120-5C18 (Thermoelectron corporation) de 250 mm x 4.6 mm con un tamaño de partícula de 5 μm eluida a 0.20 mL/min utilizando de fase móvil 75:20:5 (MeOH:ACN:H₂O). Se utilizó un sistema de dos detectores ELSD para detectar los compuestos sólidos en general, UV para detectar compuestos con el residuo de *p*-nitrofenil que absorben a 317 nm. Se realizaron blancos con los tiempos iniciales de reacción (sin lipasas) y blancos de lipasa en disolvente orgánico para identificar falsos positivos, como por ejemplo compuestos presentes en los preparados sólidos de lipasas.

3.5.3. Síntesis de glicoconjugados utilizando lipasas inmovilizadas

3.5.3.1. Inmovilización de lipasas sobre soportes macroporosos

Se colocó 0,1 mg de proteína en un criotubo junto con 10 mg de soporte y se ajustó a un volumen final de 1,5 mL con tampón fosfato de sodio 50 mM pH 7.00. La mezcla se dejó en contacto a temperatura ambiente durante 24 horas a 25 rpm. Pasado este tiempo se cuantificó por método Bradford²⁵¹ la proteína residual en el líquido supernatante y se calculó la cantidad de enzima anclada al soporte. Se filtró la mezcla y el polímero se dejó en contacto con glicina 3M pH 8,50 por 16 horas a 25 rpm. Pasado este tiempo se lavó el polímero con agua destilada y se conservó de 4-8 °C.

3.5.1.7. Actividad hidrolítica de lipasas inmovilizadas

Se pesó directamente en una cubeta de cuarzo una masa de 3 mg de enzima inmovilizada. Se añadieron 2250 μL de tampón fosfato de sodio 50 mM pH 7.00 y se colocaron en el espectrofotómetro con agitación magnética a 37°C. Se adicionaron 250 μL de *p*-nitrofenil palmitato 10 mM (*p*NFP) disuelto en 2-propanol (de esta forma la concentración final de *p*NFP fue de 1,0 mM). Se midió el incremento de absorbancia durante 3 minutos a 410 nm y se cuantificó el *p*-nitrofenol (*p*NF) liberado en el ensayo por medio de una recta de calibrado desarrollada en las mismas condiciones (punto 3.5.1.2). Se calculó la actividad en U/gramo de soporte y U/mg enzima inmovilizada. También se valoró la actividad hidrolítica en función de las cadenas de ácidos grasos, utilizando: *p*-nitrofenil butirato (*p*NFB) y *p*-nitrofenil acetato (*p*NFAc) en las mismas condiciones que el *p*NFP.

3.5.1.8. Reacciones de acilación con lipasas inmovilizadas

Tomando en cuenta que muchas de las reacciones de acilación descritas en la literatura están referidas a T-BuOH, con CAL-B inmovilizada sobre resinas acrílicas (por ejemplo nozyme 435 y chirazyme) y utilizando el ácido láurico como cadena acilante,^{193, 202} se decidió realizar la acilación del GlcNAc considerando estos factores.

Se seleccionó uno de los polímeros macroporosos probados con CAL-B en el estudio anterior, basándose en dos criterios: I) naturaleza acrílica; II) retención de actividad de la enzima inmovilizada, por ello se seleccionó el polímero 146K. Se inmovilizaron 0,60 mg de enzima sobre 60 mg de dicho polímero siguiendo el protocolo anterior y se realizó una reacción de acilación de GlcNAc utilizando laurato de vinilo como agente acilante en presencia de T-BuOH. Se probaron diversas cantidades de donador:aceptor, desde 1:2 hasta 1:30 en virtud de las distintas referencias consultadas.^{153, 157} Las condiciones utilizadas para la reacción con la enzima inmovilizada fueron las descritas en la tabla 14.

Tabla 14. Acilación de GlcNAc con laurato de vinilo utilizando CAL-B inmovilizada.

Disolvente (T-BuOH)	Enzima	Donador (laurato de vinilo)	Aceptor (GlcNAc)	Tiempo
1,00 mL	CAL-B 146K	52 µL (0,20 mmol)	23,3 mg (0,1 mmol)	48 h
1,00 mL	CAL-B 146K	130 µL (0,50 mmol)	23,3 mg (0,1 mmol)	48 h
1,00 mL	CAL-B 146K	390 µL (1,50 mmol)	23,3 mg (0,1 mmol)	48 h
1,00 mL	CAL-B 146K	780 µL (3,00 mmol)	23,3 mg (0,1 mmol)	48 h

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. SÍNTESIS DE OLIGOSACÁRIDOS CON LA β -GALACTOSIDASA DE BIOLACTA

Para llevar a cabo la síntesis enzimática de disacáridos decidimos en primer lugar utilizar la β -galactosidasa de Biolacta, que era comercializada como β -galactosidasa de *Bacillus circulans*. En primer lugar se utilizó el preparado comercial, en segundo lugar un preparado obtenido por precipitación de las proteínas con sulfato de amonio y finalmente un tercer preparado proteico obtenido tras una cromatografía de exclusión molecular y precipitación con sulfato de amonio.

Esta enzima ha sido anteriormente utilizada por nuestro grupo de investigación,^{234, 272, 273} así como otros autores para la síntesis de disacáridos de interés biológico.^{274, 275} Se sabe que esta enzima reconoce al GlcNAc como aceptor⁵⁷ y en la mayor parte de estos trabajos se utiliza el preparado comercial de esta enzima. Hasta la fecha se han publicado dos procesos de purificación de esta enzima^{59, 61} donde tras procesos de exclusión molecular con sephadex 150, intercambio iónico y elución con distintos tampones se consiguen aislar primeramente 2 diferentes β -galactosidasas en este preparado comercial⁶¹ y posteriormente Vetere y Paoletti⁶² repitieron la purificación de este preparado dando como resultado el aislamiento de tres enzimas. Los estudios de purificación difieren levemente entre sí, primeramente la enzima de mayor peso molecular aislada está entre 240 y 212 kDa según el estudio que se utilice y su actividad específica oscila entre 128 y 75 U/mg, la segunda enzima tiene un peso entre 160 y 145 kDa con una actividad entre 56 y 15 U/mg, finalmente, el estudio de Vetere y Paoletti⁶² descubre una tercera enzima de 86 kDa con una actividad de 10 U/mg, sin embargo en tales trabajos solo determinan la actividad hidrolítica de estas β -galactosidasas y por lo tanto no analizan su capacidad sintética.

4.1.1. Caracterización y purificaciones de la enzima comercial

En primer lugar se llevó a cabo la obtención de los diferentes preparados enzimáticos a partir de la β -galactosidasa Biolacta N° 5 comercial (F_0). Todos ellos fueron

caracterizados y los resultados obtenidos se muestran según el proceso de obtención de cada uno de ellos: I) la obtención de enzima semipurificada a los que se les eliminaron impurezas no proteicas por precipitación fraccionada con sulfato de amonio (al 55% y 75%), II) las fracciones proporcionadas tras una semipurificación mediante cromatografía de exclusión molecular y precipitación con sulfato de amonio (70%).

4.1.1.1. Caracterización de fracciones obtenidas por precipitación fraccionada con sulfato de amonio

En primer lugar se llevo a cabo un proceso de semipurificación por precipitación de las proteínas existentes en el preparado comercial con sulfato de amonio, con la finalidad de eliminar los distintos estabilizantes de carácter no proteico presentes en el preparado comercial de la enzima. Esta precipitación se llevó a cabo utilizando dos porcentajes diferentes de sulfato amónico tomados de las dos referencias existentes sobre la purificación de este preparado: 45%⁶¹ y 75%⁶². Además, una de las fracciones obtenidas tras esta precipitación (45 %) fue sometida a liofilización para analizar el efecto de este proceso en la actividad enzimática de la enzima. Se seleccionó dicha fracción debido a que fue la fracción con mayor cantidad de enzima precipitada.

La actividad específica de las enzimas obtenidas en el proceso de precipitación fraccionada con sulfato de amonio es bastante similar entre las distintas fracciones, oscilando desde 27 U/mg hasta 37,6 U/mg de actividad, todos éstos datos son referidos a las fracciones sin liofilizar. Los datos generales de estas fracciones se muestran en la tabla 15. La mayor cantidad de proteínas precipitan con un 45% de saturación con sulfato de amonio (52,4% de proteínas totales), un 4% de las proteínas precipita al 75% de saturación mientras que un 34% de las proteínas totales permanecen solubles en el extracto con 75% de saturación con sulfato de amonio.

De los resultados obtenidos (tabla 15) se muestra claramente que el proceso de precipitación fraccionada no separa visiblemente las tres β -galactosidasas presentes en el preparado comercial, las cuales no precipitan de forma selectiva en el intervalo de saturación con sulfato de amonio utilizado, por lo que sus actividades específicas no varían notoriamente y los factores de purificación son cercanos a 1.

Tabla 15. Caracterización general de las fracciones obtenidas de Biolacta N° 5 mediante precipitación fraccionada con sulfato de amonio.

Fracción	Paso de obtención	Proteína total (mg)	Actividad específica (U/mg)	Factor de purificación	Rendimiento (%)
F ₀	Ninguno	569	27,0	1	100
F _{M1}	Precipitación al 45%	353	28,7	1.1	62
F _{M2}	Precipitación al 75%	23	36,6	1.4	4
F _{residual}	Remanente soluble al 75%	194	37,6	1.4	34

* Dato calculado respecto a la fracción F₀.

Los perfiles de elución en geles de electroforesis desnaturalizante y nativo (figuras 22 y 23) confirman que la precipitación fraccionada con sulfato de amonio no separó de forma visible las proteínas entre las fracciones preparadas, obteniéndose geles con gran similitud entre sus bandas de proteínas. Las tres bandas predichas por la última purificación de este preparado:⁶² 212, 145 y 86 kDa se pueden apreciar en los dos geles de electroforesis realizados. Todas las fracciones sometidas a la semipurificación por precipitación fraccionada con sulfato de amonio mostraron cerca de 1 tipos de proteínas en su perfil de elución y pocas diferencias en cuanto a la intensidad de las bandas. La fracción con mayor diferencia respecto a las otras, es FM2 que muestra una pérdida de intensidad en las proteínas de alto peso molecular (mayor a 200 kDa), lo que puede explicar parcialmente la mayor actividad específica hallada en este caso (Tabla 15).

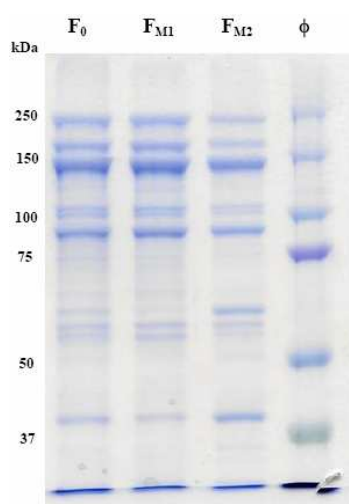


Figura 22. SDS-PAGE (7,5% de acrilamida) realizado con fracciones obtenidas por precipitación fraccionada por saturación con sulfato de amonio. Se cargaron 7 µg de proteína en cada pocillo. F₀) enzima comercial de Biolacta N°5 (Daiwa Kasei); F_{M1}) Enzima precipitada con un 55% de saturación con (NH₄)₂SO₄; F_{M2}) Enzima precipitada con un 75% de saturación con (NH₄)₂SO₄; φ) Marcadores de peso molecular comerciales (Bio Rad).

De la figura 22 también se puede apreciar que algunas proteínas de bajo peso molecular (menor a 75 kDa) desaparecen en F_{M1} y reaparecen de forma más concentrada en F_{M2}

según se aprecia en la intensidad de las bandas. Por lo que se concluye que la precipitación fraccionada con sulfato de amonio (al 45% de saturación) solo tiende a eliminar proteínas de bajo peso molecular, lo cual se puede deber a que éstas por su tamaño y densidad de carga son más solubles en el medio acuoso y pueden competir con el sulfato de amonio por mantenerse solubles en el medio.

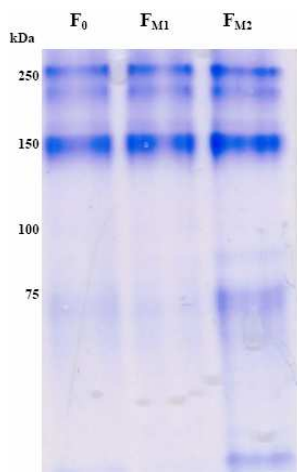


Figura 23. Gel de electroforesis de proteínas bajo condiciones no desnaturalizantes (7,5% de acrilamida) realizado con fracciones obtenidas por precipitación fraccionada por saturación con sulfato de amonio. Se cargaron 7 μ g de proteína en cada pocillo. F₀) enzima comercial de Biolacta N°5 (Daiwa Kasei); F_{M1}) Enzima precipitada con un 55% de saturación con (NH₄)₂SO₄; F_{M2}) Enzima precipitada con un 75% de saturación con (NH₄)₂SO₄.

Por otro lado se llevo a cabo la electroforesis en condiciones no desnaturalizantes (figura 23) con el objeto de analizar la posible formación de agregados de la enzima. Los geles muestran de manera general solo tres bandas principales de alto peso molecular para las fracciones de Biolacta N° 5, lo que lleva a pensar que este preparado comercial posee una serie de conglomerados de proteínas de alto peso molecular que en presencia de condiciones desnaturalizantes (figura 22) liberan subunidades y/o monómeros de menor peso molecular como consecuencia de las condiciones de la electroforesis. Si se consideran los pesos moleculares relativos en los geles de electroforesis registrados por los distintos autores que han estudiado este preparado,^{61, 62} es factible considerar la posibilidad de que la enzima pueda formar dímeros y trímeros, siendo la unidad más pequeña aislada la enzima de 86 kDa,⁶² de ser así la estructura dimérica debería rondar los 160 kDa y el trímero los 230 kDa, valores que se aproximan a los encontrados experimentalmente por tales autores.^{61, 62}

Por otra parte, el perfil de elución, confirma lo que se observó en la electroforesis con SDS, pues la fracción F_{M2} posee mayor concentración de proteínas de bajo peso molecular que no se alcanzan a ver en la preparación comercial (F₀) ni en la fracción F_{M1}.

4.1.1.2. Caracterización de la fracción sometida a liofilización

La fracción F_{M1} tras su precipitación con sulfato amónico (45%) se liofilizó y esto redujo su actividad enzimática de 28,7 U/mg hasta 17,6 U/mg en el extracto liofilizado F_{L1} , significando casi un 40% de pérdida de actividad, lo cual permite pensar que el proceso de liofilización afecta la estructura proteica causando la desnaturalización de las enzimas presentes en el extracto. Para determinar si el daño sufrido en la estructura proteica afecta la estructura cuaternaria o terciaria de la misma se realizaron procesos de electroforesis entre las fracciones mencionadas, en condiciones desnaturalizantes y no desnaturalizantes.

Los resultados de electroforesis (Figura 24) muestran que la elución de la proteína liofilizada (F_{L1}) es idéntica a la proteína sin liofilizar (F_{M1}). Esto supone que la liofilización no causa daños a la estructura cuaternaria de la proteína, pues no aparecen nuevas bandas, por lo que esta pérdida de actividad en la enzima se debe a una desnaturalización por cambios en la estructura terciaria de la proteína.

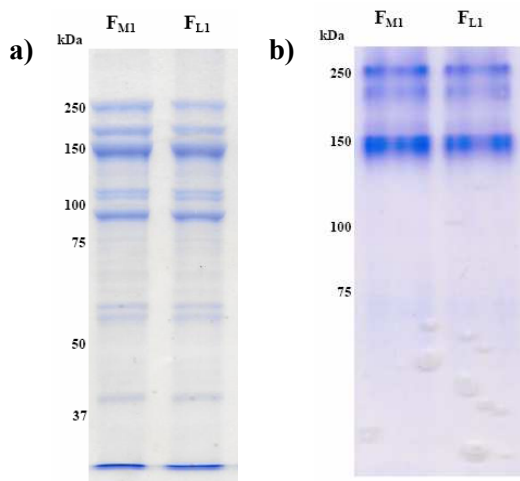


Figura 24. Perfiles de elución en gel de electroforesis (7,5% acrilamida) para proteínas de la fracción F_{M1} y su correspondiente liofilizado (F_{L1}) en condiciones a) desnaturalizantes; b) no desnaturalizantes.

Por otra parte, respecto a la eliminación del contenido no proteico en el extracto liofilizado se consiguió mejorar el porcentaje de proteínas totales por gramo de sólido liofilizado (71%) respecto al sólido original de Biolacta N° 5 que presentó un contenido inferior de proteínas (11%) consiguiendo en este proceso la eliminación de múltiples sustancias de tipo no proteico presentes en el preparado comercial. (Tabla 16)

Tabla 16. Comparación de las fracciones F_0 , F_{M1} y F_{L1} por su contenido proteico y actividad enzimática.

Fracción	Paso de obtención	% Proteína en sólido	Actividad específica (U/mg)	Actividad relativa (%)
F_0	Ninguno	11	27,0	100
F_{M1}	Precipitación al 45%	N/D	28,7	106
F_{L1}	Liofilizado de F_{M1}	71	17,6	65

* Dato calculado respecto a la fracción F_0 . N/D: No determinada debido a que es una fracción acuosa

4.1.1.3. Caracterización de fracciones semipurificadas de Biolacta

Las fracciones F_{S1} y F_{S2} fueron elaboradas por la Sara Gómez Quevedo como parte de su Máster en Biotecnología por la Universidad Autónoma de Madrid y dirigido por la Prof. Dr. María José Hernaiz, por ello con fines ilustrativos, se presentan los resultados de la purificación y las actividades específicas de las fracciones obtenidos por ésta analista (Tabla 17). Mientras que las demás caracterizaciones corresponden propiamente al trabajo experimental desarrollado en este estudio.

Tabla 17. Rendimientos generales del proceso de semipurificación de las β -galactosidasas presentes en Biolacta N° 5. (Datos proporcionados por S. Gómez.)

Fracción	Proteínas totales (mg)	Rendimiento (% Proteínas)	Actividad específica (U/mg)	Factor de purificación	Rendimiento (% U)
F_0	830	100	27,0	1,0	100
F_{S1}	44,9	5,4	32,0	1,2	17
F_{S2}	68,4	8,2	13,5	0,5	11

La electroforesis en presencia de SDS (Figura 25a) mostró 3 bandas principales para la fracción F_{S1} dentro de las cuales cabe pensar que corresponderían (al menos dos de ellas) con las β -galactosidasas I y II mencionadas en la literatura,^{134,135} cuyos pesos moleculares oscilan entre 240-212 kDa para la primera enzima y 160-145 kDa para la segunda para este preparado comercial y este dato puede justificar la mayor actividad hidrolítica encontrada para esta fracción (32,0 U/mg). Por otra parte, la tercera enzima del preparado comercial con un peso aproximado de 86 kDa desaparece de dicha la fracción.

Sin embargo los resultados mostrados por la electroforesis en condiciones no desnaturalizantes (Figura 25b) muestran que se repite la misma tendencia de conglomerados de proteínas agrupados en tres bandas de alto peso molecular (aproximadamente superior a los 140 kDa). Este hecho indicaría que en la preparación comercial utilizada en nuestros ensayos no se encontraría la tercera β -galactosidasa con un peso de 86 kDa descrita inicialmente por Vetere y Paoletti.⁶² Estos resultados nos inclinan a pensar que quizás esta enzima es en realidad una subunidad de una proteína más grande o bien podría darse la situación de que sea un monómero de un conglomerado de proteínas (por ejemplo un trímero).

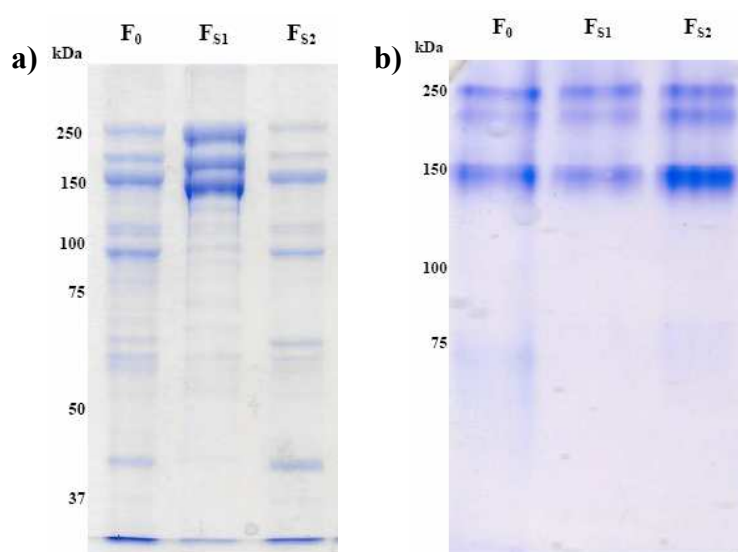
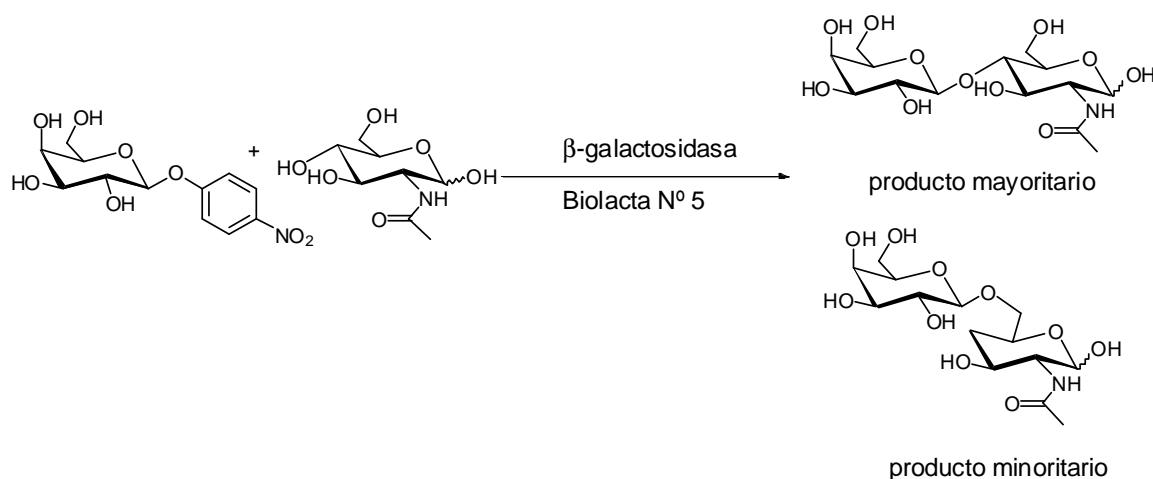


Figura 25. Perfiles de elución en gel de electroforesis (7,5% acrilamida) para proteínas semipurificadas obtenidas de Biolacta en condiciones **a)** desnaturalizantes; **b)** no desnaturalizantes. Se utilizaron 5 μ g de proteína por cada pocillo.

4.1.2. Síntesis de disacáridos con la β -galactosidas Biolacta en medios acuosos tamponados

En estudios previos llevados a cabo por nuestro grupo de investigación se determinaron las condiciones óptimas para llevar a cabo la síntesis enzimática de disacáridos utilizando la β -galactosidas de Biolacta.^{13, 276} En estos estudios se determinó que el sustrato reconocido por esta enzima como aceptor era el GlcNAc y en estas condiciones la enzima era capaz de sintetizar mayoritariamente el isómero β -(1 \rightarrow 4) y en menor proporción el isómero β -(1 \rightarrow 6) (Esquema 17). Por ello para la reacción de síntesis de disacáridos se emplearon el *p*NF- β -Gal como donador (0,17M) y GlcNAc como aceptor (0,85M) y como biocatalizador se emplearon las diferentes fracciones obtenidas de Biolacta

obtenidas en el apartado anterior siguiendo los lineamientos del punto 3.3.2.1. Los resultados obtenidos aparecen reflejados en la figura 26 y como puede observarse la reacción se completó a los 30 minutos de reacción. Por lo que a las 3 horas existe una completa certeza de que la reacción se ha terminado.



Esquema 17. Síntesis de disacáridos con β-galactosidasas de Biolacta, utilizando *p*NF-β-Gal como donador (0,17M) y GlcNAc como aceptor (0,85M). El producto mayoritario posee enlaces β(1→4) (LacNAc) mientras que el minoritario posee enlaces β(1→6) (AloLacNAc)

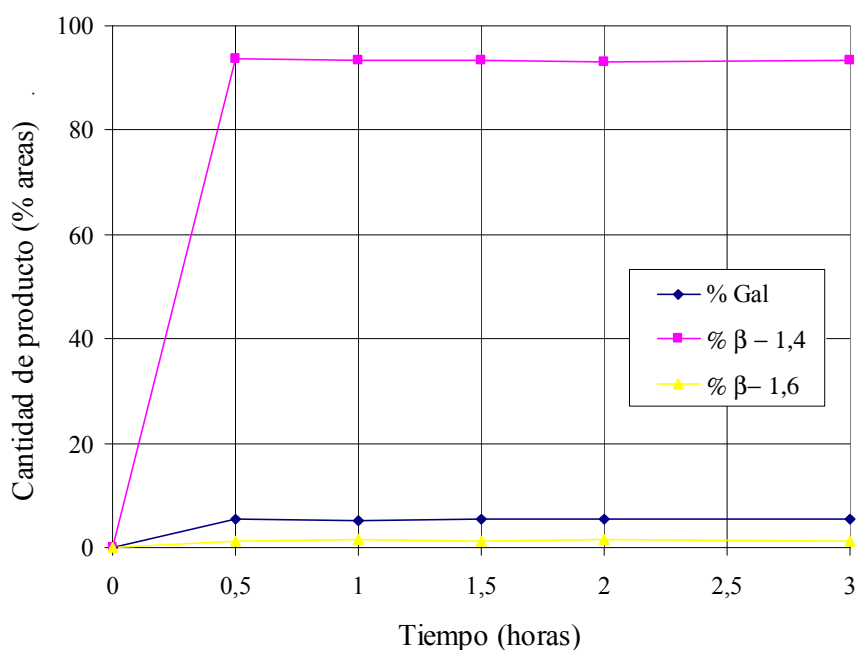


Figura 26. Cinética modelo de una reacción de transglucosidación utilizando *p*NF-β-Gal como donador (0,17M) y GlcNAc como aceptor (0,85M) en presencia de 155 unidades de Biolacta N° 5 (preparado comercial) en tampón fosfato/citrato de sodio pH 5,0, 50 mM. Los porcentajes relativos a cada producto fueron calculados con base en las áreas de los cromatogramas obtenidos por HPLC-ELSD.

Los resultados mostrados en la Figura 26 confirman los datos bibliográficos^{73, 74, 79} respecto a la actividad sintética de Biolacta N°5, en donde el principal producto de la transglicosidación es la *N*-Acetil lactosamina (Gal β [1 \rightarrow 4]GlcNAc). Tomando como base la cinética mostrada en la Figura 26, se decidió comparar los resultados obtenidos en las reacciones de transglicosidación en las mismas condiciones (excepto para F_{S2} que utilizó solo 7,2 unidades enzimáticas dada su baja actividad hidrolítica). La reacción se llevó a cabo con las distintas fracciones enzimáticas obtenidas en el apartado anterior (4.1.1) y se detuvo a las tres horas de reacción. (Tabla 18).

Tabla 18. Resultados obtenidos en reacciones de transglicosidación realizadas con las fracciones derivadas β -galactosidasa comercial de Biolacta en medios acuosos tamponados con fosfato/citrato de sodio pH 5,00 50 mM.

Fracción	Hidrólisis (galactosa)	Disacárido β [1 \rightarrow 4]	Disacárido β [1 \rightarrow 6]	Tiempo de reacción (h)
F ₀	6	93	1	3
F _{L1}	100	--	0	3
F _{S1}	71	--	29	3
F _{S2}	--	99	1	3

En todos los casos, las diferentes fracciones analizadas de ésta enzima favorecen el isómero β (1 \rightarrow 4) ó la hidrólisis del sustrato, antes que la síntesis del isómero β [1 \rightarrow 6] (Tabla 18). La fracción liofilizada (F_{L1}) mostró una tendencia altamente hidrolítica, probablemente originada por la desnaturalización de enzimas debido a la liofilización, lo que pudo alterar la estructura terciaria de la proteína, como se explicó en el apartado 4.1.1.2 y con ello afectar la actividad de la enzima, en este caso, favoreciendo notablemente la hidrólisis sobre la síntesis durante la reacción de transglicosilación.

La fracción F_{S1} mostró una preferencia hacia la hidrólisis, hecho claramente justificado por su alta actividad específica (32,0 U/mg). Esta fracción mostró una mayor presencia de proteínas de alto peso molecular en geles de electroforesis desnaturalizante (SDS-PAGE) pero no muestran proteínas menores de 100 kDa, como la III isoenzima mencionada por Vettere y Paoletti⁶² la cual posee un peso de aproximadamente 86 kDa, por lo que es factible pensar que las dos primeras isoenzimas corresponderían a proteínas específicamente hidrolíticas.

Los resultados con la fracción semipurificada F_{S2} mostraron ser los más relevantes de los datos obtenidos por la alta regioselectividad con una clara tendencia a la síntesis del isómero Gal- β [1 \rightarrow 4]-GlcNAc de la síntesis con éste preparado enzimático y la poca hidrólisis, la Figura 27 muestra una comparación entre los cromatogramas de HPLC para esta fracción y el preparado comercial.

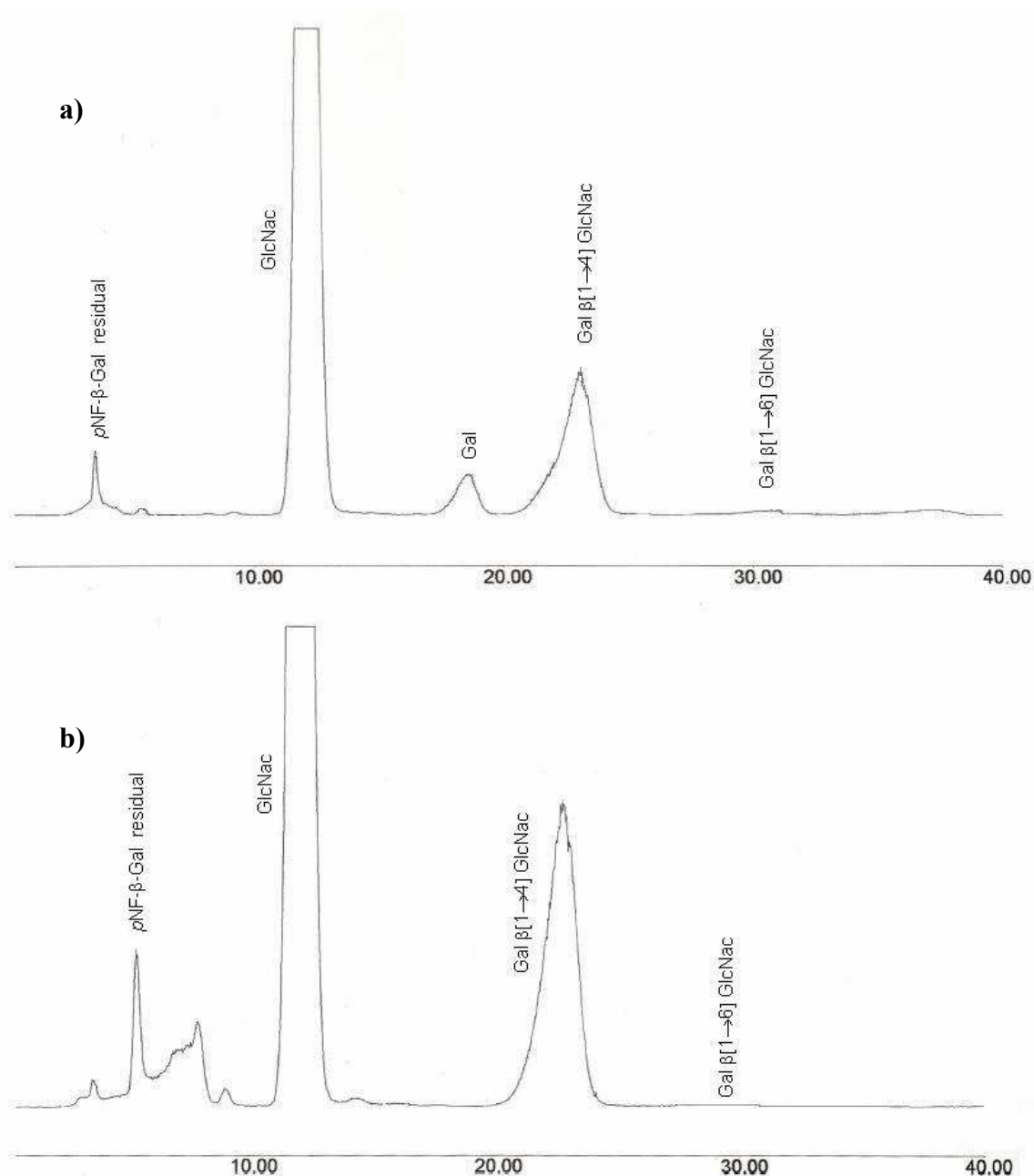


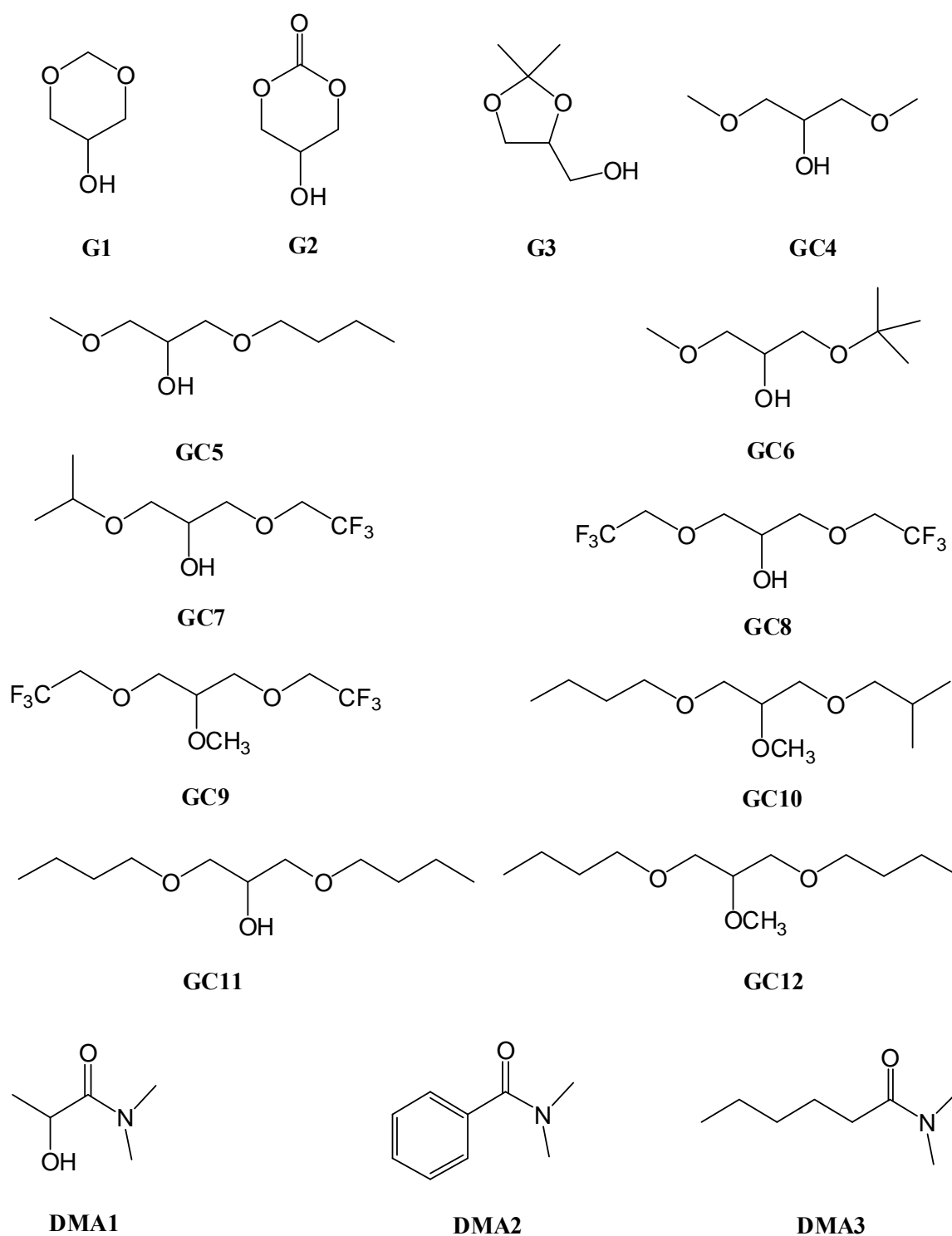
Figura 27. Cromatogramas obtenidos por HPLC-ELSD para la reacción entre GlcNAc y pNF-β-Gal en tampón citrato/fosfato de sodio, pH 5,0, 50 mM. Las muestras fueron tomadas luego de 3 horas de reacción y se trataron de la misma forma. **a)** Reacción con enzima comercial (Biolacta N° 5); **b)** reacción con la fracción semipurificada F_{S2} .

Esta marcada tendencia sintética alcanzada por la fracción F_{S2} puede estar relacionada con la presencia de subunidades visibles en el SDS-PAGE y que están ausentes en la fracción F_{S1}. Estas subunidades estarían vinculadas a la síntesis de disacáridos pero no así en la hidrólisis, hecho que se ve claramente reflejado por una actividad específica de hidrólisis de 13,5 U/mg similar a la actividad del preparado comercial (10 U/mg, según los datos de S. Gómez).

4.1.3. Síntesis de disacáridos con la β -galactosidas Biolacta en presencia de disolventes verdes

Estudios previos realizados por el grupo de investigación,^{13, 272, 273} han demostrado que la utilización de este preparado comercial en presencia de determinados disolventes verdes que son en su mayoría producidos de subproductos de la industria (como el glicerol) y de biomasa (como los derivados de la *N,N*-dimetil amida), producen un cambio en la regioselectividad en la reacción de transglicosidación favoreciendo el isómero con enlaces $\beta(1\rightarrow6)$. En estos estudios previos,^{13, 272, 273} llevados a cabo con la enzima comercial se determinó la concentración de disolventes verdes necesaria para obtener los mejores resultados (2M). En estos estudios,^{13, 272, 273} se utilizaron diferentes disolventes verdes obtenidos a partir de biomasa, las estructuras de los mismos aparecen representadas en la Figura 28. Por su procedencia y tipo de estructura, éstos disolventes se clasifican en tres grupos: 1- derivados cíclicos del glicerol, 2- derivados de cadena abierta del glicerol 3- derivados de la *N,N*-dimetil amida. Los disolventes de cadena abierta obtenidos a partir del glicerol fueron preparados por el Grupo de Investigación del Prof. Dr. José Ignacio García¹⁸ y los derivados cíclicos del glicerol así como de las alquilaminas fueron proporcionados por la empresa Cognis IP Management GmbH, de Alemania, ahora parte de la empresa BASF.

Los resultados obtenidos previamente²⁷³ con la enzima comercial y los derivados de cadena abierta del glicerol aparecen en la esquema 18. Los disolventes utilizados muestran una tendencia a modificar la regioselectividad de la enzima favoreciendo el disacárido con enlaces $\beta(1\rightarrow6)$ y disminuyendo los porcentajes de disacárido con enlaces $\beta(1\rightarrow4)$.



Esquema 18. Disolventes verdes utilizados en este estudio: 1- Los disolventes G1-G3 corresponden a derivados cíclicos del glicerol. Los disolventes GC4-GC12 corresponden a derivados de cadena abierta del glicerol sintetizados por el grupo del Prof. Dr. Jose Ignacio García. Los disolventes DMA1-DMA3 corresponden a derivados de la *N,N*-dimetilamida. La nomenclatura utilizada corresponde a la referencia previa de nuestro grupo.¹³

Tabla 19. Rendimientos de transglicosilación obtenidos con los distintos disolventes derivados del glicerol de cadena abierta con las β -galactosidasa de Biolacta. (Datos tomados de estudios previos del grupo de investigación).²⁷²

Medio	log P ^a	$\mu(D)^a$	Densidad	ϵ^a	E_T^{Na}	Gal	Gal- β -(1 \rightarrow 4)-GlcNAc (%)	Gal β -(1 \rightarrow 6)GlcNAc (%)
Tampón	0.00	1.85				-	84	17
Glycerol	-1.33	-	1,261			35	14	9
GC4	-0.60	3.00	1,068	13.0	0.61	-	15	85
GC5	0.14	2.40	0,942	7.0	0.48	-	23	77
GC6	0.27	2.36	0,912	6.6	0.44	-	13	87
GC7	1.14	3.36	1,121	12.0	0.59	-	-	93
GC8	1.42	4.10	1,359	14.6	0.70	-	-	100
GC9	1.71	4.20	1,270	13.7	0.55	79	-	21
GC10	1.93	2.30	0,897	5.2	0.46	-	17	83
GC11	2.07	2.40	0,893	5.6	0.45	-	-	92
GC12	2.48	2.20	0,890	4.7	0.15	-	21	71

^a Valores tomados de García y col. a menos que se indique lo contrario.¹⁸ ^b Valores tomados de Mainar y col.²⁷⁷ ^c Valores tomados de Hong y col.²⁶¹ ^d Valores tomados de Laurence y col.²⁷⁸.

Así mismo, los disolventes derivados del glicerol (con estructura cíclica) y derivados de la *N,N*-dimetilamida han sido probados en la síntesis de disacáridos con las β -galactosidasas de Biolacta. Los efectos de éstos disolventes sobre la regioselectividad de la enzima han seguido una tendencia similar, favoreciendo el disacárido con enlaces β (1 \rightarrow 6) y disminuyendo los porcentajes de disacárido con enlaces β (1 \rightarrow 4). Estos resultados de estudios previos se muestran en la Tabla 20.

Tabla 20. Porcentajes de rendimiento en las reacciones de transglicosilación obtenidos con la β -galactosidasa de Biolacta en buffer citrato/fosfato 50 mM a pH 5.0 y 2 M de disolvente verde en dicho buffer. (Datos tomados de estudios previos del grupo de investigación).²⁷³

Disolvente	Densidad (g.mL ⁻¹)	log P	Sistema de reacción	Galactosa (%)	Gal β -(1 \rightarrow 4)GlcNAc (%)	Gal β -(1 \rightarrow 6)GlcNAc (%)
Buffer	-	-	homogéneo	-	83	17
G1	1.235	-0,57	homogéneo	-	9	91
G2	1.405	-0,24	homogéneo	81	13	7
G3	1.063	0,03	homogéneo	-	29	71
DMA1	1.063	-0,69	homogéneo	-	9	91
DMA2 ^a	1.147	1,41	homogéneo	-	83	12
DMA3	0.905	1,42	homogéneo	-	24	75

^a El disolvente DMA2 es un sólido en condiciones de temperatura y presión ambiente (1 atm and 25°C)

4.1.3.1. Síntesis de disacáridos con la β -galactosidasa de Biolacta y disolventes derivados del glicerol

La fracción F_{LI} fue utilizada en las condiciones de reacción descritas en el punto 3.3.2.1. en presencia de disolventes verdes a una concentración 2M de cada uno de éstos. Los disolventes derivados del glicerol que fueron utilizados son los siguientes: G1, CG7, CG8 y CG11 (ver figura 28). Se seleccionaron dichos disolventes debido a los importantes resultados obtenidos previamente con ellos (punto 4.1.3). Los resultados utilizando ésta fracción enzimática fueron relativamente distintos a los obtenidos con la enzima comercial.

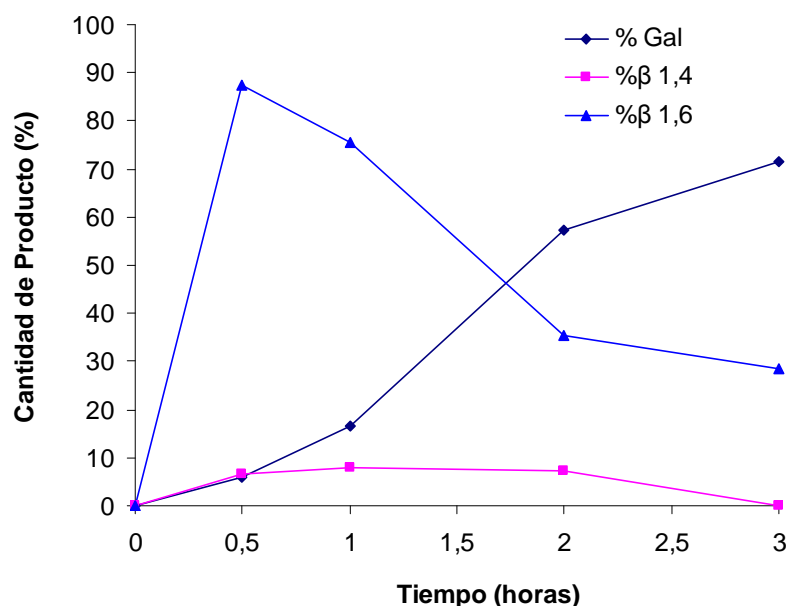


Figura 28. Cinética modelo de una reacción de transglicosidación utilizando p NF- β -Gal como donador (0,17M) y GlcNAc como aceptor (0,85M) en presencia de 155 unidades de F_{LI} (fracción liofilizada) en tampón fosfato/citrato de sodio pH 5,0, 50 mM con un medio 2M de GC7. Los porcentajes relativos a cada producto fueron calculados con base en las áreas de los cromatogramas obtenidos por HPLC-ELSD.

Por un lado, durante el proceso de reacción fue posible observar en todos los casos un precipitado blanco (incluyendo la reacción en tampón y que no se ha presentado en las demás preparaciones de Biolacta N° 5 utilizadas), que luego de determinaciones con el método Bradford y de electroforesis se identificó como proteína precipitada. Esto solo confirmó la desnaturalización sufrida por la fracción F_{LI} debido a la pérdida de estructura terciaria de algunas proteínas en el proceso de liofilizado.

Por otra parte, un comportamiento cinéticamente distinto fue observado en éstas reacciones, en todos los casos, excepto en el tampón, se alcanzó un máximo de síntesis por transglucosidación a los 30 minutos de reacción, favoreciendo claramente el isómero $\beta(1\rightarrow6)$. Después de 30 minutos la tendencia obtenida fue la desaparición del producto, que fue hidrolizado aumentando la producción de galactosa. La figura 28 muestra una cinética típica alcanzada con uno de los disolventes utilizados en este medio de reacción (GC7). Por este motivo se consideraron tiempos finales de reacción a los 30 minutos, sin embargo para efectos comparativos con las demás fracciones estudiadas se midieron también a las 3 horas, éstos datos se muestran en la tabla 21. De los disolventes utilizados, el G1 pareció evitar de mejor forma la reacción de hidrólisis sobre los productos sintetizados, tras 3 horas de reacción, sin embargo, en todos los casos se obtuvieron mejores resultados de síntesis (excepto en el medio con tampón) a los 30 minutos.

Tabla 21. Resultados obtenidos en reacciones de transglucosidación realizadas con la fracción F_{L1} obtenida de Biolacta N° 5 en medios acuosos tamponados con fosfato/ citrato de sodio pH 5,0, 50 mM y 2 M en presencia de disolventes verdes derivados del glicerol. Los porcentajes de cada producto fueron calculados con base en las áreas obtenidas mediante HPLC-ELSD.

Medio	Hidrólisis (galactosa)	Disacárido $\beta[1\rightarrow4]$	Disacárido $\beta[1\rightarrow6]$	Tiempo de reacción (horas)
Tampón	100	--	--	0,5
G1	9	6	85	0,5
GC7	6	6	88	0,5
GC8	28	11	61	0,5
GC11	9	9	82	0,5
Tampón	100	--	--	3,0
G1	36	8	56	3,0
GC7	71	--	29	3,0
GC8	53	--	47	3,0
GC11	48	15	37	3,0

Estos cambios de regioselectividad corroboran nuestros resultados previos obtenidos con el preparado comercial,¹³ donde demostramos que los disolventes: G1, GC7, CG8 y CG11 tienden a modificar la regioselectividad de las enzimas presentes en Biolacta N° 5. El presente estudio logra demostrar que tales cambios de regioselectividad no están vinculados a los componentes no proteicos presentes en la preparación comercial (que corresponden a cerca de un 88% en masa del preparado crudo de Biolacta) descartando

de ésta forma una modificación de regioselectividad relacionada con tales impurezas y por las evidencias obtenidas es factible pensar que tales cambios están probablemente vinculados a las interacciones con éstos disolventes.^{272, 279}

4.1.3.2. Síntesis de disacáridos con fracciones semipurificadas de Biolacta y disolventes derivados del glicerol

Siguiendo la metodología descrita en el punto 3.3.2.1, se realizó la síntesis de disacáridos con las fracciones semipurificadas de Biolacta: F_{S1} y F_{S2} en presencia de disolventes verdes a una concentración 2M de cada uno de éstos. Los disolventes utilizados fueron: G1, GC7, GC8 y GC11, se realizó un ensayo en tampón para comparar los resultados. La Tabla 22 muestra los resultados obtenidos tras 3 horas de reacción.

Tabla 22. Resultados obtenidos en reacciones de transglicosidación (%) realizadas con 9 unidades enzimáticas de las fracciones semipurificadas (F_{S1} y F_{S2}) obtenidas de Biolacta N° 5 en medios 2M en disolventes verdes y tamponados con fosfato/ citrato de sodio pH 5,0, 50 mM. Los porcentajes de cada producto fueron calculados con base en las áreas obtenidas mediante HPLC-ELSD.

Fracción	Medio	Hidrólisis (galactosa)	Disacárido $\beta[1\rightarrow4]$	Disacárido $\beta[1\rightarrow6]$
F _{S1}	Tampón	100	0	0
F _{S1}	G1	100	0	0
F _{S1}	GC7	100	0	0
F _{S1}	GC8	100	0	0
F _{S1}	GC11	100	0	0
F _{S2}	Tampón	0	100	0
F _{S2}	G1	3	80	17
F _{S2}	GC7	1	89	10
F _{S2}	GC8	3	69	28
F _{S2}	GC11	3	69	28

Como se puede apreciar en la Tabla 22, la fracción inicial obtenida en la semipurificación de Biolacta (F_{S1}) muestra una altísima tendencia a la hidrólisis, la cual no se modifica con la presencia de disolventes verdes. Por otra parte, la siguiente fracción obtenida: F_{S2} mostró una baja actividad específica que evidenció preliminarmente su baja tendencia a hidrolizar, hecho confirmado en la reacción efectuada en tampón, donde se obtiene un 100% de área para el isómero $\beta[1\rightarrow4]$.

Esta tendencia se modificó parcialmente en todos los casos con los disolventes verdes empleados, obteniéndose cerca de un 20% del isómero $\beta[1\rightarrow6]$, lo que podría indicar que el cambio de regioselectividad es específico para una determinada fracción de enzimas (probablemente una enzima en específico), lo que corrobora en parte, la modificación de la regioselectividad encontrada por Perez¹³ para Biolacta en presencia de tales disolventes y el mismo fenómeno antes señalado para los extractos proteicos de éste preparado comercial.

4.1.3.3. Síntesis de disacáridos con la β -galactosidasa de Biolacta y disolventes derivados de la *N,N*-dimetilamida.

De los distintos disolventes derivados de la *N,N*-dimetil amida previamente evaluados²⁷³ (punto 4.1.3), los mejores resultados se obtuvieron con el DMA1. Por lo que se seleccionó como cosolvente para el medio de reacción. La cinética de la reacción (Figura 29) sigue el mismo modelo que la cinética encontrada con los disolventes derivados del glicerol. La mayor cantidad de producto $\beta(1\rightarrow6)$ se obtiene a los 30 minutos, el isómero $\beta(1\rightarrow4)$ resulta poco favorecido a lo largo de toda la reacción y la reacción de hidrólisis compite con la síntesis del disacárido $\beta(1\rightarrow6)$.

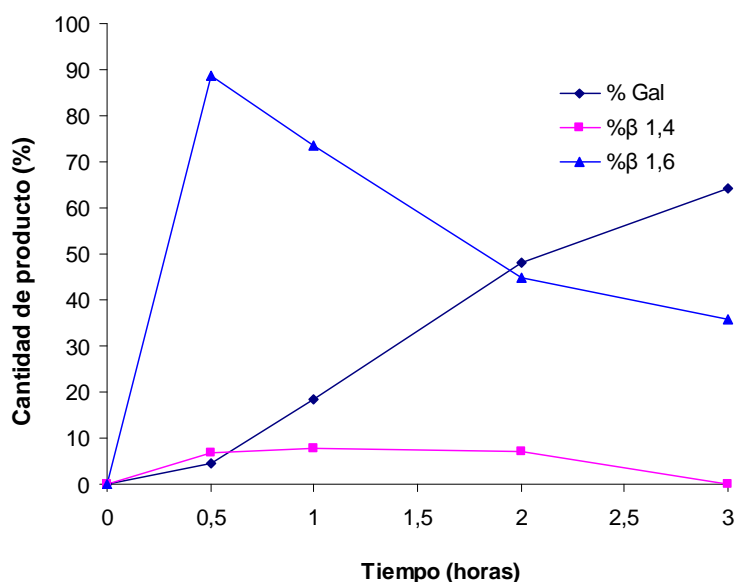


Figura 29. Cinética modelo de una reacción de transglucosidación utilizando *p*NF- β -Gal como donador (0,17M) y GlcNAc como aceptor (0,85M) en presencia de 155 unidades de F_{L1} (fracción liofilizada) en tampón fosfato/citrato de sodio pH 5,0, 50 mM con un medio 2M de DMA1. Los porcentajes relativos a cada producto fueron calculados con base en las áreas de los cromatogramas obtenidos por HPLC-ELSD.

En la tabla 23 se muestran los resultados de la reacción a los 30 minutos de reacción y a las 3 horas, debido a las diferencias encontradas en ambos tiempos de muestreo. Nuevamente los resultados obtenidos demuestran un efecto del disolvente sobre la regioselectividad de la reacción para la obtención del isómero $\beta(1\rightarrow6)$ mientras que el isómero $\beta(1\rightarrow4)$ sigue estando desfavorecido. La reacción en medio enriquecido con DMA1 parece tener una competencia entre la reacción de síntesis que ocurre con rapidez, y luego de haber sintetizado el producto, la reacción de hidrólisis comienza a consumir el producto de síntesis favoreciendo la liberación de galactosa al medio. La reacción en medio acuoso favorece la hidrólisis desde el inicio de ésta, lo que evidencia un efecto del disolvente para inhibir la reacción de hidrólisis y hacer que esta transcurra a una menor velocidad.

Tabla 23. Resultados obtenidos en reacciones de transglicosidación realizadas con la fracción F_{L1} obtenida de Biolacta N° 5 en medios acuosos tamponados con fosfato/ citrato de sodio pH 5,0, 50 mM y 2 M en presencia de DMA1. Los porcentajes de cada producto fueron calculados con base en las áreas obtenidas mediante HPLC-ELSD.

Medio	Hidrólisis (galactosa)	Disacárido $\beta[1\rightarrow4]$	Disacárido $\beta[1\rightarrow6]$	Tiempo de reacción (horas)
Tampón	100	--	--	0,5
DMA1	5	7	88	0,5
Tampón	100	--	--	3,0
DMA1	64	--	36	3,0

4.1.3.4. Síntesis de disacáridos con las fracciones semipurificadas de Biolacta y disolventes derivados de la *N,N*-dimetilamida.

Siguiendo la metodología descrita en el punto 3.3.2.1, se realizó la síntesis de disacáridos con las fracciones semipurificadas de Biolacta: F_{S1} y F_{S2} en presencia de DMA1, se realizó un ensayo en tampón para comparar los resultados. La Tabla 24 muestra los resultados obtenidos tras 3 horas de reacción. De los resultados obtenidos, se obtiene una tendencia similar a la obtenida con las fracciones semipurificadas (F_{S1} y F_{S2}) en los disolventes verdes derivados del glicerol (punto 4.1.3.2), donde la fracción F_{S1} es altamente hidrolítica mientras que la fracción F_{S2} muestra una tendencia hacia la síntesis del isómero $\beta(1\rightarrow4)$ sin ser afectada por los disolventes verdes como ocurre con las fracciones F_{L1} . Este fenómeno podría indicar que el cambio de regioselectividad es

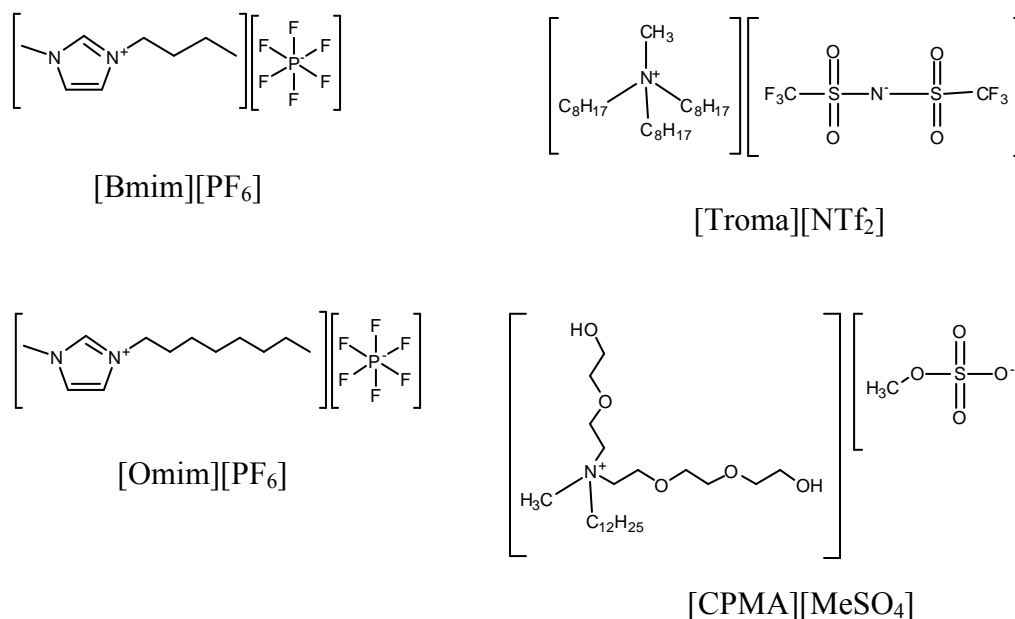
específico para una determinada fracción de enzimas (probablemente una enzima en específico), y que debido al proceso de purificación dicha enzima podría haber sido removida del preparado crudo original.

Tabla 24. Resultados obtenidos en reacciones de transglucosidación (%) realizadas con 9 unidades enzimáticas de las fracciones semipurificadas (F_{S1} y F_{S2}) obtenidas de Biolacta N° 5 en medios 2M en DMA1 tamponado con fosfato/ citrato de sodio pH 5,0, 50 mM. Los porcentajes de cada producto fueron calculados con base en las áreas obtenidas mediante HPLC-ELSD.

Fracción	Medio	Hidrólisis (galactosa)	Disacárido $\beta[1\rightarrow4]$	Disacárido $\beta[1\rightarrow6]$
F_{S1}	Tampón	100	0	0
F_{S1}	DMA1	100	0	0
F_{S2}	Tampón	0	100	0
F_{S2}	DMA1	1	81	18

4.1.3.3. Síntesis de disacáridos con Biolacta y líquidos iónicos.

Con el ánimo de analizar la influencia de estos disolventes verdes en las reacciones de transglucosidación llevadas a cabo por la β -galactosidasa Biolacta, decidimos ampliar el tipo de disolventes verdes utilizados para este tipo de reacciones. En este caso decidimos utilizar diferentes tipos de líquidos iónicos. La cantidad de líquido utilizada para cada reacción fue de un 30%, ya que los datos Kaftzik y colaboradores¹²⁶ demuestran que las enzimas de biolacta presentan mejores rendimientos y una mayor estabilidad cuando se utilizan en concentraciones similares. Los LIs utilizados en este estudio aparecen representados en el esquema 19. Se evaluaron en total 4 diferentes líquidos iónicos, en su mayoría insolubles en agua a temperatura ambiente e incluso a las temperaturas de reacción (37°C), siendo esto es una gran ventaja por que permite plantear la recuperación del líquido iónico por simples procedimientos como la centrifugación y decantación. Este es el caso de: [Bmim][PF₆], [Omim][PF₆] y [Troma][Ntf₂]. En algunos casos se utilizaron cationes derivados del imidazolio ([Bmim][PF₆] y [Omim][PF₆]) y en otros casos derivados de amonio cuaternario [CPMA][MeSO₄] y [Troma][Ntf₂]. Como aniones se utilizaron de forma predominante el hexafluorofosfato (PF₆⁻), la bis triflimida (Ntf₂⁻), y el metilsulfato (MeSO₄⁻).



Esquema 19. Estructura de los líquidos iónicos utilizados en las reacciones de transglucosilación con la β -galactosidasa de Biolacta.

Siguiendo la metodología descrita en el punto 3.3.4, se realizó la síntesis de disacáridos con la enzima comercial Biolacta N° 5 en presencia de líquidos iónicos a una concentración del 30% (v/v) de cada uno de éstos. La cinética de esta síntesis es muy similar a la cinética obtenida en medio acuoso tamponado, donde la regioselectividad está dirigida hacia la síntesis del isómero $\beta(1\rightarrow4)$ y la reacción termina a los 30 minutos, manteniendo constante las cantidades de los productos a lo largo del tiempo. (Figura 30)

El estudio se realizó para cuatro líquidos iónicos distintos ([Bmim][PF₆], [Omim][PF₆], [CPMA][MeSO₄] y [Toma][Ntf₂]) y un control en medio acuoso tamponado. En la mayoría de los casos los resultados fueron similares, favoreciéndose la síntesis del disacárido con enlace $\beta(1\rightarrow4)$ y minimizando las otras reacciones. Sin embargo el líquido iónico [Troma][Ntf₂] mostró una ligera tendencia a producir el isómero $\beta(1\rightarrow6)$ a lo largo de la reacción, llegando a alcanzar un porcentaje de 40% luego de tres horas (Figura 31). En este caso, el líquido iónico parece modificar la regioselectividad acelerando de manera moderada la síntesis de uno de los isómeros respecto a su comportamiento habitual en medio acuosos tamponado.

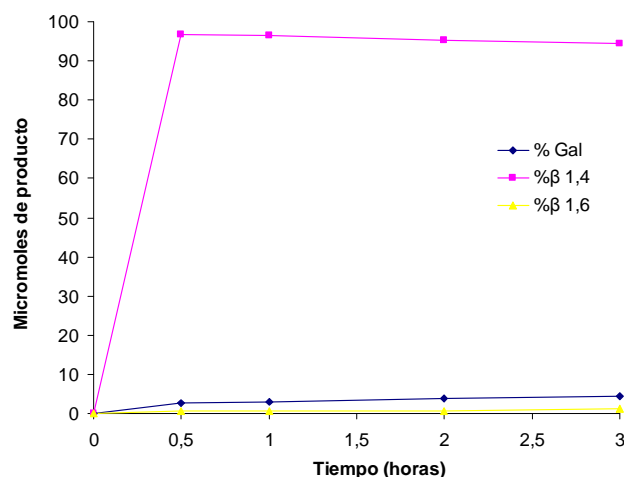


Figura 30. Cinética de la reacción de transglicosidación con la enzima comercial de Biolacta en tampón fosfato/citrato de sodio pH 5,0, 50 mM con un 30% (v/v) de [Troma][Ntf₂]. Los porcentajes relativos a cada producto fueron calculados con base en las áreas de los cromatogramas obtenidos por HPLC-ELSD.

Los resultados presentados en la Tabla 25 muestran que especialmente dos líquidos iónicos ([Omim][PF₆] y [CPMA][MeSO₄]) de los cuatro estudiados, presentan una mayor tendencia a la hidrólisis respecto a la enzima en medio tamponado y cierta modificación en la regioselectividad de la reacción favoreciendo hasta obtener un 40% del producto β[1→6]. En el caso de los otros dos LIs ([Bmim][PF₆] y [Toma][Ntf₂]) se obtuvieron resultados similares a los obtenidos en tampón, en el caso de [Toma][Ntf₂] se superó ligeramente el % de isómero β[1→4]. obtenido en presencia de solo tampón (95%).

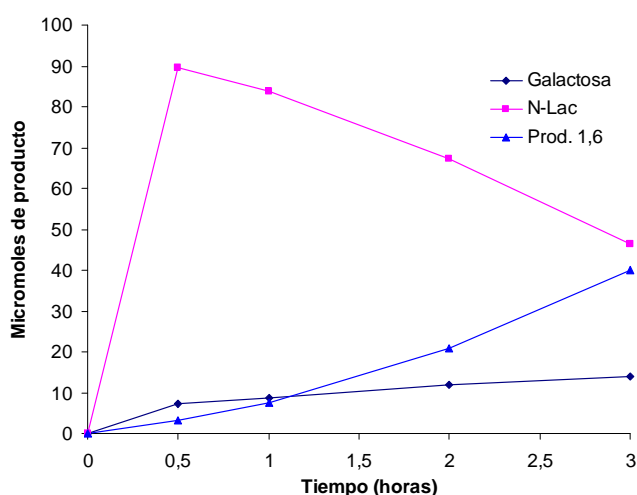


Figura 31. Cinética de la reacción de transglicosidación con la enzima comercial de Biolacta en tampón fosfato/citrato de sodio pH 5,0, 50 mM con un 30% (v/v) de [Omim][PF₆]. Los porcentajes relativos a cada producto fueron calculados con base en las áreas de los cromatogramas obtenidos por HPLC-ELSD.

Tabla 25. Resultados obtenidos luego de 3 horas en reacciones de transglicosidación realizadas con la enzima comercial (75 unidades de Biolacta N° 5) en medios acuosos tamponados con fosfato/ citrato de sodio pH 5,0, 50 mM y en presencia de líquidos iónicos como cosolventes (30% v/v). Los porcentajes de cada producto fueron calculados con base en las áreas obtenidas mediante HPLC-ELSD.

Medio	Hidrólisis (galactosa)	Disacárido $\beta[1\rightarrow4]$	Disacárido $\beta[1\rightarrow6]$
Tampón	6	93	1
[Bmim][PF ₆]	9	81	10
[Omim][PF ₆]	14	46	40
[CPMA][MeSO ₄]	12	72	16
[Troma][Ntf ₂]	4	95	1

4.1.4. Análisis proteómico de las proteínas presentes en Biolacta N° 5

4.1.4.1. Análisis de proteínas fijadas en SDS-PAGE

Considerando las modificaciones en cuanto actividad sintética entre la fracción F_{S2} (con la mayor regioselectividad hacia $\beta[1\rightarrow4]$ en medio tamponado) y las demás fracciones estudiadas, se decidió inicialmente analizar una banda de proteínas cuyo peso molecular observado en el SDS-PAGE se aproximó a 86 kDa (Figura 32), valor determinado por Vetere y Paoletti⁶² como la III β -galactosidasa presente en Biolacta. Esta banda fue una de las más visibles en F_{S2} y dado que F_{S1} no mostró actividad sintética (careciendo de dicha banda) se pensó que dicha proteína tenía vinculación con el proceso de síntesis del disacárido $\beta[1\rightarrow4]$. El análisis proteómico realizado a dicha muestra consistió en dos estudios: masa molecular y huella peptídico.

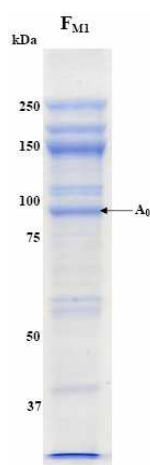


Figura 32. SDS-PAGE (7,5% acrilamida) para la fracción F_{M1} enviada para análisis de huella peptídica y masa molecular. La zona señalada como A₀ corresponde a la proteína seleccionada de dicho gel para análisis.

Según los resultados de la Unidad de Proteómica de la Universidad Complutense de Madrid, el análisis de los fragmentos de péptidos mostró una similitud de un 98% en la estructura de la proteína con la β -galactosidasa de *Streptococcus pneumoniae* SP9-BS68 cuya masa molecular es de aproximadamente 247 kDa, este dato se determinó con una significancia estadística de $p \leq 0,05$. Los valores de homología con otras proteínas en éstas condiciones muestran en total 20 posibles análogas que, además de la ya mencionada, poseen entre un 93% de homología (*S. pneumoniae* GSP14) hasta un 74% (*S. pneumoniae* CDC1087-00). Todas éstas 20 proteínas con alta similitud pertenecen sin excepción a la misma especie: *S. pneumoniae* variando únicamente en la cepa (hace más de tres décadas que la especie *Diplococcus pneumoniae* se empieza a conocer como *Streptococcus pneumoniae*).⁴⁴⁰

Hasta la fecha se conocen tres genes de β -galactosidasas de la especie *B. circulans* anotadas en bases de datos, dos de ellas corresponden a la cepa G1 (bgaA y bgB) y la tercera se aisló en la cepa ATCC 31382 (bgaC)⁵⁵, sin embargo en el análisis de huella peptídica realizado no se obtuvo ningún resultado de homología con éstas proteínas. Los resultados obtenidos permiten explicar en primer lugar por que la banda de proteína que aparece en aproximadamente 86 kDa en el SDS-PAGE está ausente en el gel bajo condiciones no desnaturalizantes. Esto indica que dicha proteína es en realidad un componente de una proteína de mayor peso molecular, probablemente una subunidad o quizás un monómero. Por ello, el peso de 247 kDa obtenido mediante la huella peptídica se asemeja mucho al peso molecular relativo de 240 kDa obtenido para la β -galactosidasa I, aislada por Mozaffar y colaboradores.⁶¹ Estos autores solo lograron aislar dos enzimas de éste tipo en el preparado de Biolacta N° 5 con pesos de 240 kDa y 160 Kda, el suponer una tercera proteína de aproximadamente 86 kDa permite pesar que ésta es un monómero, mientras que las siguientes enzimas de 160 kDa y 240 kDa serían el dímero y trímero correspondientes de tal monómero. Sin embargo tomando en cuenta que la β -galactosidasa de *S. pneumoniae* posee una secuencia genética conocida, la cual codifica un monómero de 247,3 kDa²⁸⁰, es más probable asumir que los valores de 160 kDa y 86 kDa reportados para β -galactosidasas presentes en Biolacta N° 5 correspondan con posibles sub unidades de igual tamaño y con actividad hidrolítica.

Finalmente, la literatura consultada ha mostrado algunas discrepancias entre la β -galactosidasa de *B. circulans* ATTC31382 y las β -galactosidasas presentes en Biolacta N° 5. En primera instancia la tendencia sintética de la enzima de *B. circulans* ATTC31382 es hacia la formación de enlaces β [1→3] glicosídicos llegando a tener incluso un extremo terminal de *p*-nitrofenol en los productos sintetizados^{91, 97, 345}, mientras que la enzima de Biolacta favorece los enlaces β [1→4] sin restos de *p*NF, un resultado similar al obtenido con la especie *S. pneumoniae*.²⁸¹

Por otra parte, la β -galactosidasa de *B. circulans* ATTC31382 que sintetiza enlaces β [1→3] no esta presente en la preparación de Biolacta lo que permanece sin ser aclarado⁵⁵ hasta la fecha. En cambio se conoce que la β -galactosidasa de *S. pneumoniae* es una proteína de superficie que al parecer no está involucrada en el metabolismo de lactosa sino en la ruptura de oligosacáridos de membranas²⁸⁰ cuya actividad hidrolítica hacia los enlaces β [1→4] es inusualmente específica, favoreciendo 10 veces más al sustrato Gal[1→4]GlcNAc antes que lactosa.²⁸² Por tanto las evidencias experimentales del presente trabajo así como la bibliografía consultada sugieren que el preparado comercial de Biolacta N° 5 posee en su composición una β -galactosidasa de *S. pneumoniae*, más no la β -galactosidasa de *B. circulans* ATTC31382.

4.1.4.2. Análisis de proteínas de Biolacta fijadas en geles de electroforesis bajo condiciones no desnaturalizantes.

Los resultados mostrados en el punto anterior, plantearon la necesidad de realizar un gel de electroforesis en condiciones no desnaturalizantes para seleccionar las bandas de peso molecular más aproximado a los datos de la literatura 240 kDa y 160 Kda según Mozaffar y colaboradores⁶¹, mientras que Vetere y Paoletti⁶² las estimaron en 212 kDa, 145 kDa y 86 kDa. El gel realizado a la fracción F_{S2} bajo condiciones no desnaturalizantes (Figura 33) mostró un total de 3 bandas predominantes: una primera banda (A₁) con un peso de aproximadamente 250 kDa, una segunda banda (A₂) cercana a los 200 kDa y una tercera banda (A₃) ligeramente inferior a los 150 kDa que mostró una mayor intensidad respecto a las dos primeras bandas.

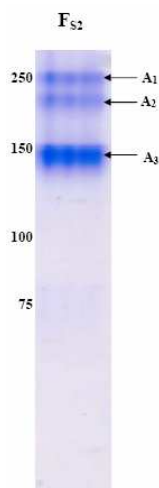


Figura 33. Gel de electroforesis en condiciones no desnaturalizantes (7,5% acrilamida) obtenido para la fracción F₅₂. Las zonas señaladas como A₁, A₂ y A₃, corresponden a las proteínas seleccionadas de dicho gel para análisis de huella peptídica.

Estos datos no permitían seleccionar las proteínas descritas en las referencias consultadas^{93, 94}, por lo que se decidió analizar cada una de éstas tres bandas mediante el análisis de huella peptídica. Los resultados de las bandas A₁, A₂ y A₃ obtenidos en el análisis de huella peptídica mostraron algo que tiende a confirmar la idea de que las tres bandas respondan a estructuras multiméricas por ensamblaje de subunidades y/o monómeros de proteínas. El espectro de masas (Figura 34) de las tres bandas muestra una altísima similitud entre sí, lo que sugiere que las tres proteínas analizadas están formadas por las mismas secuencias de aminoácidos, que al ser tratados con tripsina generan los mismos péptidos y por ello sus espectros de masas muestran las mismas secuencias de descomposición de iones.

Pese al gran número de péptidos fragmentados para su análisis e identificación en bases de datos, los resultados mostraron en este caso poca homología, dando positivo solamente dos de todos los péptidos analizados con un 34,1% de homología con la β -galactosidasa de *Bifidobacterium bifidum* JCM 1254 para el primero de los péptidos y 29,1% con la β -galactosidasa de *Streptomyces hygroscopicus* ATCC 53653 para el segundo de éstos. Esto ha hecho suponer que la β -galactosidasa de *B. circulans* (al menos la presente en Biolacta N° 5) no está registrada en bases de datos.

Nuevamente no se encontró ninguna similitud estructural con las β -galactosidasas de *B. circulans* presentes en las bases de datos analizadas (NCBI) y descritas en la literatura como bgaA, bgaB y bgaC.⁵⁵ De las tres secuencias analizadas no se encontró

correspondencia entre la fragmentación obtenida en el análisis de huella peptídica y las secuencias de β -galactosidasas de *B. circulans* registradas en bases de datos, lo que sugiere que las proteínas sometidas a este análisis proteómico bien pueden no estar registradas en bases de datos o pueden no pertenecer a la especie *B. circulans* ATCC 31382.

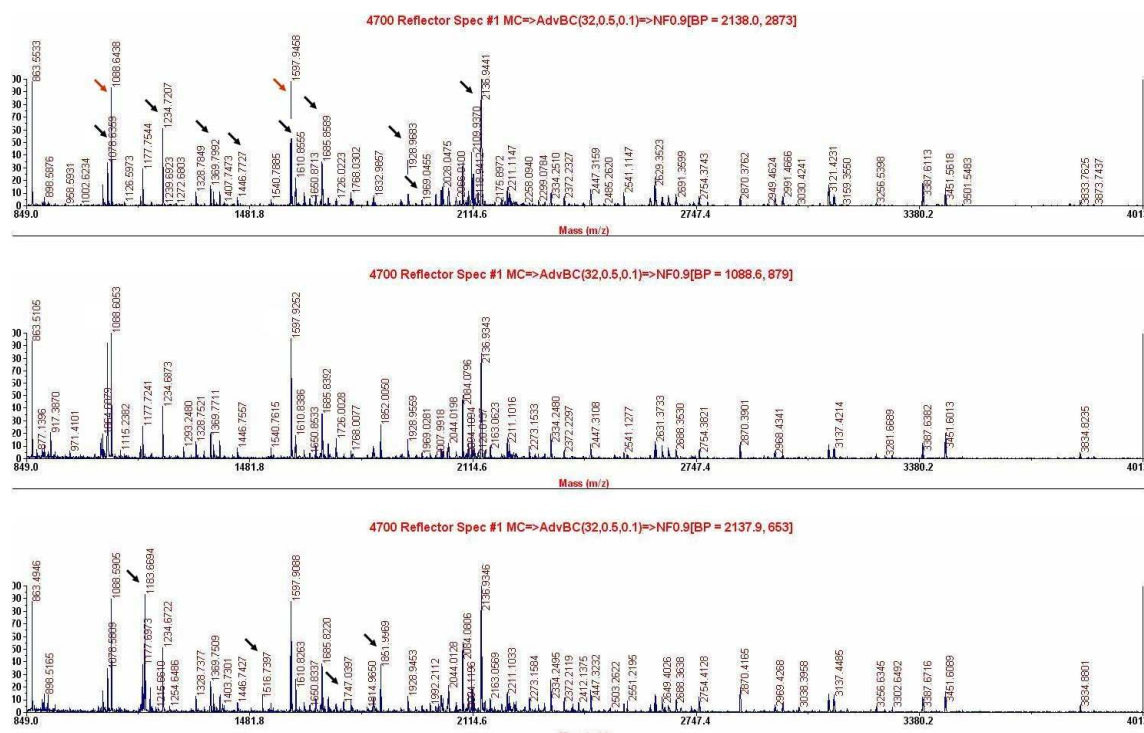


Figura 34. Espectro de masas para péptidos obtenidos por ruptura enzimática con tripsina de las proteínas seleccionadas como A₁, A₂ y A₃ en el gel de electroforesis bajo condiciones no desnaturizantes. Las secciones señaladas con flechas corresponden a péptidos fragmentados para secuenciar. Las flechas de color rojo corresponden a péptidos que están relacionados con β -galactosidasas identificadas en bases de datos.

4.1.5. Estudios de modelado molecular y docking con enzimas de Biolacta

Con el objetivo de obtener una explicación a nivel molecular de los cambios de regioselectividad observados para la β -galactosidasa Biolacta en presencia de algunos disolventes verdes se decidió realizar un estudio de interacción enzima-disolvente mediante modelado molecular, docking y dinámica molecular.

Para ello se construyó un modelo tridimensional de la β -galactosidasa de *S. pneumoniae* (98% de homología encontrada en el apartado 4.1.3.1.) en presencia de estos disolventes

verdes y el sustrato donador (*p*NF- β -Gal) y aceptor (GlcNAc) fueron situados en el centro activo de este modelo. Posteriormente se llevaron a cabo dinámicas moleculares en presencia y en ausencia de disolventes y se compararon los resultados entre ellas.

4.1.5.1. Centro activo de la β -galactosidasa de *Biolacta*

El centro activo fue localizado usando una combinación de la secuencia de la enzima, alineamiento estructural y un docking ciego. El modelo de la enzima reveló que el centro activo podría ser similar al de *E. coli* (*lacZ*). La superimposición de la estructura de un monómero y el modelo utilizado llevaron a la identificación del par de aminoácidos del centro catalítico, siendo éstos: Glu-564 y Glu-645, con este proceso se consiguió también determinar el comportamiento químico de cada uno de ellos: el residuo Glu-564 corresponde con el residuo Glu-537 de *LacZ* el cual está actualmente aceptado como nucleófilo.²⁶⁰ Mientras que el residuo Glu-645 fue identificado como el ácido catalítico, este hecho es concordante con los primeros resultados de docking.

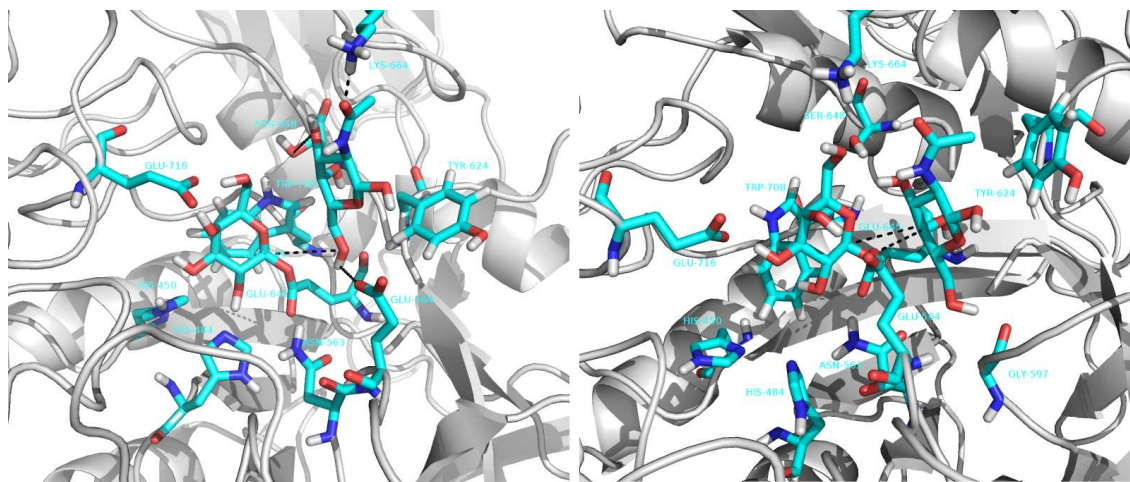


Figura 35. Modos de unión de la enzima con sustratos en el centro activo: a) a la izquierda modo poco profundo con un sistema de agua-GC8, a la derecha simulación en modo profundo realizada en agua.

Se observó que el sustrato tiende a localizarse cerca del aminoácido Glu-645, orientado sobre el residuo de Trp-708. Este tipo de interacciones han sido ampliamente investigadas,²⁸³ y se ha identificado como crucial para otras galactosidasas. Las interacciones adicionales con los residuos His-450, His-484, Asn-563 y Glu-716 contribuyen a estabilizar la molécula tal y como se puede ver en la Figura 35.

Después de modelar el complejo sustrato-enzima, (utilizando para ello el *p*NF- β -Gal) se realizó el docking de GlcNAc en el centro activo de la enzima. Se seleccionó la mejor solución para este docking como punto de inicio para simular las dinámicas moleculares. Las distancias entre el carbono anomérico (C1) y los hidroxilos 4 y 6 (O4 y O6) de la molécula del aceptor, se confirmaron como indicadores validos de la mejor posición para ser atacada y correlacionada con la regioespecificidad de varias enzimas utilizadas en la síntesis de carbohidratos.¹⁷⁸ Con este objetivo, se midieron las distancias entre C1, los grupos O4 y O6, los átomos de oxígeno de Glu-564 y los protones de cada grupo hidroxilo.

Se prestó especial atención a la información estructural del centro activo, en especial por el modo de unión diferencial entre las simulaciones, entre el O-4 y el O-6 del GlcNAc hacia el C1 del donador, lo que podría explicar el cambio en la regioselectividad mostrado por la enzima cuando se coloca el disolvente, pasando de formar enlaces de tipo $\beta(1\rightarrow4)$ a $\beta(1\rightarrow6)$. Las distancias medias se presentan en la tabla 26 junto con el RMSD (del inglés “*root mean square deviation*” que significa raíz media de desviación de los cuadrados,) de los carbonos alfa.

Tabla 26. Distancias medias (Å) entre el carbono anomérico (C1) y los grupos hidroxilos (O4 y O6) y valores RMSD de la simulación.

	C1-O6	C1-O4	COO ⁻ -HO-C6	COO ⁻ -HO-C4	RMSD C _{α} (Å)
Agua	5.76 ^a	5.26 ^a	5.73 ^a	5.81 ^a	2.27
GC8-agua	4.79	7.89	7.42	8.93	1.93

^a Despues de cambiar de posición.

La tabla 26 muestra que las distancias entre el carbono anomérico de la galactosa del sustrato donador (*p*NF- β -Gal) y el oxígeno del carbono 6 se reducen cuando hay una mezcla de GC8 disuelto en agua, respecto al medio acuoso, donde la distancia más corta es la del O-4 del GlcNAc y el C-1 del donador. Estas mediciones confirman los datos obtenidos en la síntesis química con las enzimas de biolacta.

4.1.5.2. Simulación en agua

Inicialmente el docking realizado en medio acuoso tamponado mostró una clara preferencia por el O6, siendo este resultado incompatible con el dato experimental, ya que la enzima bajo estas condiciones prefiere el O4. Sin embargo, durante las simulaciones de dinámica molecular, las distancias desde el carbono anomérico al O4 y el O6 cambian a los 700 ps, indicando una variación en la configuración del aceptor. En efecto, se observó un nuevo modo de unión, en el cual el aceptor se encuentra más profundo dentro del centro activo, interactuando principalmente con los residuos: Tyr-624 y Lis-664.

Este cambio que favorece el ataque del O-4 del aceptor hacia el C-1 del donador, podría ser una consecuencia de efecto de empuje que ejerce el agua debido a la naturaleza hidrofóbica de la cadena de acetilo presente en el GlcNAc, la cual parece interactuar con el residuo de Tyr-624. La distancia entre el C-1 del donador y el O-4 del GlcNAc se encontró más favorable, aunque el O-6 permanece lo suficientemente cerca como para permitir la formación de enlaces, de esta forma la enzima favorece los enlaces $\beta(1\rightarrow4)$ y puede sintetizar también $\beta(1\rightarrow6)$, tal y como ocurre experimentalmente.

4.1.5.3. Simulación de GC8-agua

En el caso de la mezcla de reacción que contiene GC8 en disolución acuosa, el docking coincide con el producto experimental (Gal- $\beta(1\rightarrow6)$ -GlcNAc). El donador muestra durante toda la simulación una clara preferencia por el O-6 del aceptor, favoreciendo la formación del enlace $\beta(1\rightarrow6)$. Sin embargo, se encontró una interacción clave presente en este complejo: el residuo Ser-648 interactúa con el grupo hidroxilo O-4 del aceptor. Esta interacción no está presente en la simulación realizada con agua debido al modo de unión de la molécula y esto podría contribuir a la estabilización de complejo. En este caso la cadena de acetilo no ejerce un efecto de empuje sobre el aceptor. Aparentemente, la interacción con el disolvente no es desfavorable como ocurrió con el agua, y la molécula adopta un modo de unión poco profundo con las mismas interacciones que en esencia ocurren en el modo profundo (Tyr-624 y Lys-664) con la interacción adicional con el residuo de Ser-648.

Las distancias medidas durante la dinámica molecular están correlacionadas con los resultados experimentales, en los cuales la formación del isómero $\beta(1\rightarrow6)$ es mayoritario en presencia de la mezcla de GC8 (2M)-H₂O, mientras que el isómero $\beta(1\rightarrow4)$ se obtiene como producto principal en las reacciones llevadas a cabo en medio acuoso. En la superimposición de ambas estructuras del docking (H₂O y GC8-H₂O, Figura 36) se puede apreciar que los oxígenos involucrados en la reacción poseen las distancias apropiadas para llevar a cabo el ataque nucleofílico hacia el C-1 (ubicado en residuo catalítico Glu-564), en el caso del sistema acuoso, el O4 se sitúa a 5.26 Å y el O6 del sistema GC8-H₂O a 4.79 Å).

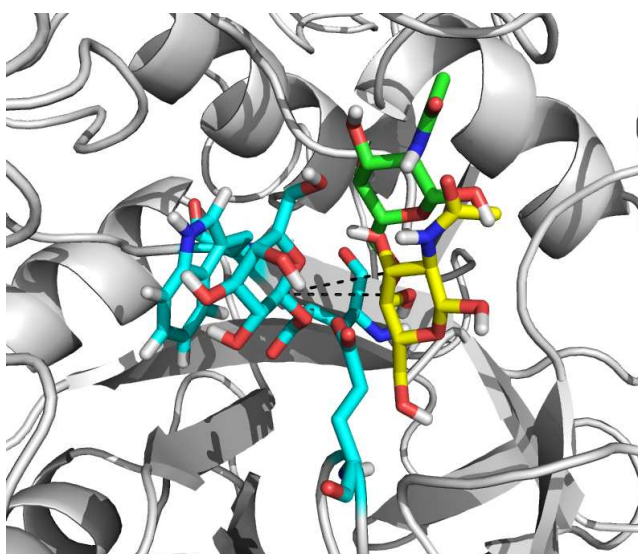


Figura 36. Superimposición de los dos modos de unión: poco profundo en verde y profundo en amarillo. Los residuos catalíticos se muestran en celeste. Se pueden observar la superimposición del O6 (poco profundo) y O4 (profundo)

Los efectos del aceptor en la síntesis de disacáridos han sido descritos antes,⁵⁸ y se ha demostrado que éste puede afectar el producto final de la reacción. Particularmente, algunos grupos presentes en el aceptor podrían facilitar el acercamiento del sustrato a los residuos catalíticos e inducir un cambio en la conformación del azúcar. Este es el caso del grupo 2-acetamido presente en el GlcNAc sobre el cual se han determinado importantes influencias en la regioselectividad de la reacción en general, ya que puede afectar la orientación del aceptor dentro del centro activo y limitar su ataque nucleofílico debido a problemas de repulsión estérica.^{58, 284} En el presente estudio, la interacción entre el grupo acetilo del GlcNAc y el disolvente parecen ser los principales factores que desencadenan

un cambio en el modo de unión en los cuales las moléculas pueden alcanzar una posición adecuada para realizar el ataque nucleofílico en el centro activo, mejorando la accesibilidad de grupos O-4/O-6 y con ello la regioselectividad del proceso.

4.2. SÍNTESIS DE DISACÁRIDOS CON BIOCATALIZADORES TERMÓFILOS

Se utilizaron distintos biocatalizadores de tipo termófilo, todos ellos proporcionados por el grupo del Prof. Dr. José Berenguer del CBMSO (CSIC). Se utilizaron extractos celulares de *Thermus thermophilus* HB27 inducidos (al cultivarse en medios enriquecidos con celobiosa) para aumentar su actividad de tipo β -galactosidasa y β -fucosidasa. Se utilizaron los extractos celulares del mutante de *T. thermophilus* T42Kat al que se le ha eliminado la enzima TTP0042 por medio de una interrupción de su gen. Se ha clonado, expresado y purificado la enzima TTP0042 en *T. thermophilus* PNar y en *E. coli* BL21De, también se clonó la enzima TTP0222 y se expresó y purificó en *E. coli* BL21De.

La síntesis de disacáridos utilizando extractos celulares y enzimas de la cepa HB27 de *Thermus thermophilus* se ha dividido en cuatro secciones: 1) El estudio propio con los microorganismos termófilos y sus extractos celulares: HB27 y T42kat; 2) El estudio con enzimas recombinantes que han sido clonadas y expresadas en *E. coli*: TTP0042 his₆tag y TTP0222his₆tag y la enzima TTP0042 his₆tag clonada en HB27Nar; 3) El estudio de interacciones entre la enzima TTP0042 y líquidos iónicos en donde se utilizaron técnicas como: SPR, dicroísmo circular, fluorescencia y modelado molecular.

4.2.1. Producción y caracterización de los distintos biocatalizadores termófilos

4.2.1.1. Síntesis utilizando extractos celulares de HB27 inducido con celobiosa

En estudios previos dentro del grupo de investigación y en colaboración con el grupo del Prof. Dr. José Berenguer (CBMSO),^{13, 70, 262} se investigó sobre posibles inductores que al adicionarse al medio de cultivo de *T. thermophilus* HB27, pudiesen actuar como inductores de la actividad β -glicosidasa. Como resultado de dicho trabajo, se encontró que de los azúcares utilizados, la celobiosa actúa como inductor de las actividades β -galactosidasa, β -fucosidasa y α -glucosidasa (ver Figura 37).²⁶²

Este fenómeno de inducción debido a la celobiososa, también ha sido descrito dentro del género *Thermus*,⁷¹ y en organismos mesófilos como *Bifidobacterium breve* 203.²⁸⁵⁻²⁸⁷ La inducción de la actividad β -glicosidasa en *T. thermophilus* HB27 ha sido estudiada por el grupo del Prof. Dr. Berenguer, quienes han logrado establecer que la enzima TTP0042 (que es la β -glicosidasa más importante de dicho microorganismo)²⁶² se expresa desde un sistema operón de degradación de celobiososa.⁷⁰

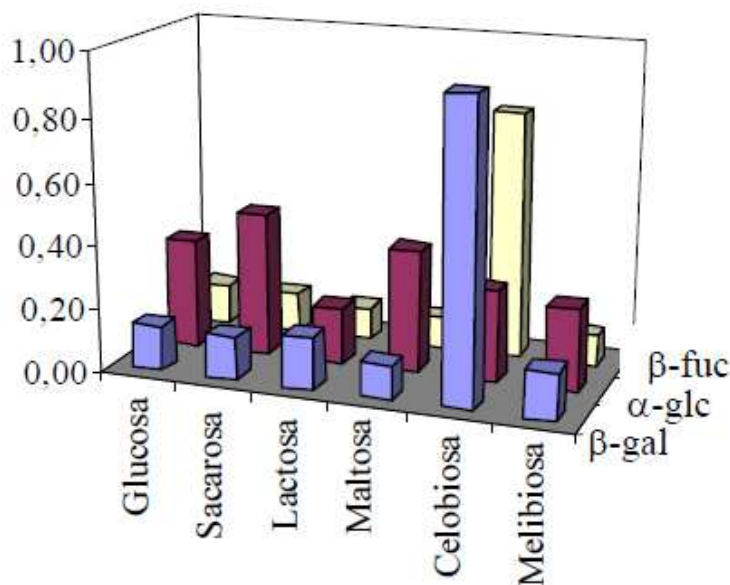


Figura 37. Actividades enzimáticas obtenidas para *T. thermophilus* HB27 cultivado en presencia de distintos azúcares como inductores. Información tomada de datos previos del grupo de investigación en colaboración con el grupo del Prof. Dr. Berenguer.¹³

Para el presente trabajo, los extractos celulares de la cepa HB27 inducida con celobiososa fueron sometidos a un estudio de parámetros bioquímicos para estimar las condiciones óptimas de trabajo de éstos biocatalizadores (utilizando como sustratos *p*NF- β -Gal y *p*NF- β -Fuc), por ello a continuación se muestran los resultados de esta caracterización.

pH óptimo

Los extractos celulares de HB27 inducido con celobiososa se sometieron a un estudio de pH óptimo según la metodología descrita en el punto 3.4.1.2. Este biocatalizador muestra una mayor actividad en pH ligeramente ácidos entre 5,00 y 6,50, con pequeñas diferencias en cuanto a su actividad relativa en función del sustrato. La hidrólisis de *p*NF- β -Gal es

máxima en a pH 5,50 mientras que si el sustrato utilizado es *pNF-β-Fuc* el pH óptimo es 6,50. Como se puede apreciar en la figura 38 los valores relativos (referidos a la máxima actividad alcanzada con uno de los sustratos utilizados, *pNF-β-Fuc*), el rango de pH óptimo es mucho más amplio cuando el azúcar liberado en hidrólisis es la fucosa, en este caso se obtienen valores de actividad que superan por mucho los máximos obtenidos cuando el azúcar liberados es la galactosa. Esto se puede deber a que la enzima TTP0042 presente en los extractos de HB27 tiene una mayor tendencia a hidrolizar enlaces de tipo β -fucosidos que los β -galactósidos, tal y como ha sido determinado previamente en la literatura consultada,^{13, 72} esto sugiere que los extractos de HB27 inducidos son influidos de manera notoria por la actividad de la enzima TTP0042 en cuanto a su actividad hidrolítica.

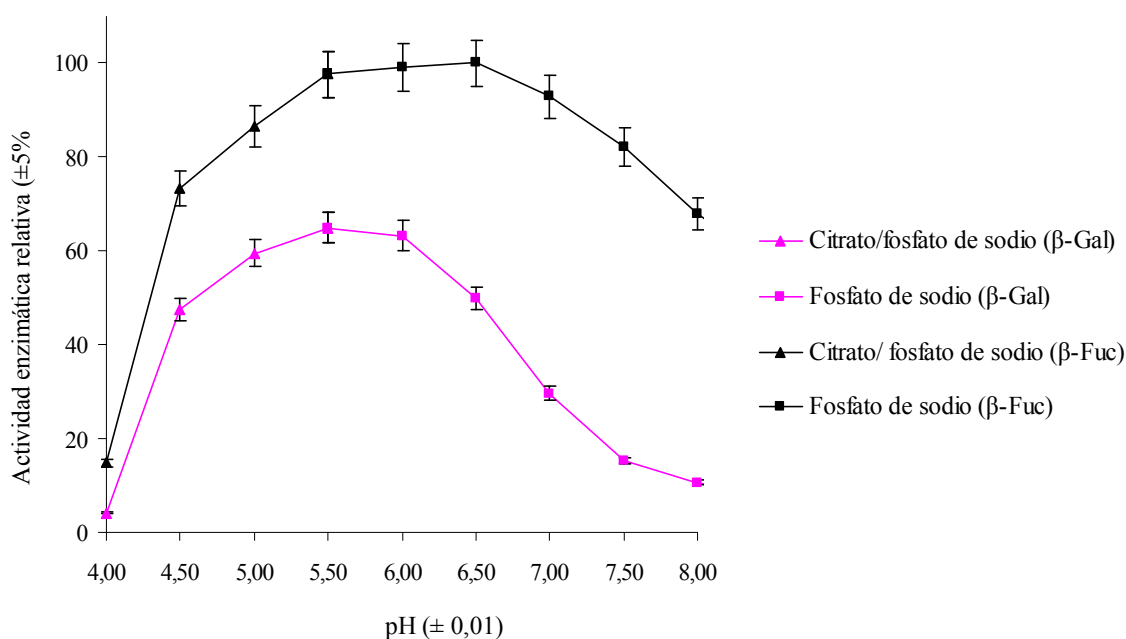


Figura 38. Efecto del pH en la actividad enzimática de los extractos de HB27 inducidos sobre los sustratos *pNF-β-Gal* y *pNF-β-Fuc* a 80°C en un medio 1 mM. El pH se ajustó con los tampones citrato/fosfato de sodio y fosfato de sodio 50 mM. Las actividades están referidas en términos relativos al valor máximo determinado.

Tampón óptimo

El efecto del tipo de solución amortiguadora sobre la actividad de los extractos celulares de HB27 se midió en los valores óptimos de pH determinados para cada actividad enzimática, utilizando una concentración 50 mM de cada tampón a 80 °C y 1 mM de

sustrato. Los resultados presentados en la tabla 27, muestran que las diferencias en cuanto a la actividad enzimática fueron relativamente pequeñas en la mayor parte de los tampones utilizados, llegando incluso a estar dentro del margen de error experimental (medido como la desviación estándar del procedimiento).

Tabla 27. Dependencia de la actividad β -galactosidasa y β -fucosidasa de los extractos celulares (inducidos) de *T. thermophilus* HB27, a 80°C, 1 mM en sustrato y 50 mM de tampón en función del tipo de tampón.

Tampón utilizado	Actividad relativa (%)	
	β -galactosidasa (pH 5,50)	β -fucosidasa (pH 6,50)
Fosfato de sodio	100 \pm 3	100 \pm 3
Ácido cítrico/ Citrato de sodio	97 \pm 3	100 \pm 3
Citrato / fosfato de sodio	91 \pm 3	90 \pm 3
Ácido acético/acetato de sodio	84 \pm 3	93 \pm 3
MES	91 \pm 3	97 \pm 3

Tanto la actividad β -galactosidasa como la β -fucosidasa muestran valores máximos en tampones fosfato de sodio y citrato de sodio. Sin embargo el tampón fosfato/ citrato de sodio, que representa la mezcla de los tampones que despliegan mayor actividad enzimática, es una mezcla amortiguadora que disminuye casi en un 10% la actividad de éstos extractos.

Efecto de la fuerza iónica del tampón y de sales añadidas

Se consideró el efecto de la salinidad propia del tampón en la actividad enzimática utilizando concentraciones de 25, 50, 75 y 100 mM de fosfato de sodio (tampón óptimo en las condiciones de pH óptimas para cada actividad enzimática). Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 28. En dicha tabla se puede concluir que la salinidad del buffer fosfato de sodio no tiene variaciones significativas sobre la actividad enzimática en el rango desde 25 mM hasta 100 mM.

Tabla 28. Efecto de la concentración del tampón en la actividad β -galactosidasa y β -fucosidasa de los extractos celulares (inducidos) de *Thermus thermophilus* HB27, a 80°C, 1 mM de sustrato, bajo en condiciones de pH y tampón óptimo.

Concentración del tampón (fosfato de sodio)	Actividad relativa (%)	
	β -galactosidasa (pH 5,50)	β -fucosidasa (pH 6,50)
25	100 \pm 3	94 \pm 3
50	92 \pm 3	99 \pm 3
75	94 \pm 3	99 \pm 3
100	95 \pm 3	100 \pm 3

Las tendencias encontradas muestran un pequeño efecto de la salinidad del tampón sobre la actividad enzimática, favoreciéndose bajas molaridades: 25 mM para la actividad β -galactosidasa y 50-100 mM para la actividad β -fucosidasa. Fijando como parámetros óptimos de salinidad 25 mM para la actividad β -galactosidasa y 50 mM para la actividad β -fucosidasa se analizó el efecto de la fuerza iónica (medida como concentración NaCl) sobre los extractos celulares de HB27 inducido con celobiosa. Dichos resultados se muestran en la tabla 29.

Tabla 29. Efecto de la concentración del NaCl en la actividad β -galactosidasa y β -fucosidasa de los extractos celulares (inducidos) de *T. thermophilus* HB27, a 80°C, 1 mM de sustrato, bajo en condiciones de pH, tampón y salinidad de tampón óptimas.

Concentración de cloruro de sodio (mM)	Actividad relativa (%)	
	β -galactosidasa (fosfato de sodio 25 mM pH 5,50)	β -fucosidasa (fosfato de sodio 50 mM pH 6,50)
0	100 \pm 2	94 \pm 2
25	98 \pm 2	100 \pm 2
50	95 \pm 2	96 \pm 2
75	96 \pm 2	96 \pm 2
100	95 \pm 2	93 \pm 2

Los resultados muestran congruencia con los datos obtenidos en la salinidad del tampón, la actividad β -galactosidasa es favorecida en ambientes de poca salinidad (ya sea del tampón o del sales adicionadas a éste), mientras que la actividad β -fucosidasa posee

condiciones más amplias de trabajo que van desde un rango de pH más amplio, hasta mayor resistencia a la salinidad del tampón sin mayores efectos en la actividad obtenida (100 mM) algo que pareció ser congruente con la salinidad del cloruro de sodio, donde el biocatalizador muestra pocas diferencias debido a la salinidad incluso hasta 75 mM de ésta sal.

Temperatura óptima

Una vez presentes los parámetros de pH, tipo de tampón, salinidad del tampón y de cloruro de sodio óptimas para éstos extractos celulares, se analizó el efecto de la temperatura sobre la actividad enzimática en las condiciones óptimas previamente estimadas. Estos resultados se muestran en la figura 39.

Los datos de la figura 39 muestran una mayor actividad fucosidasa en todos los casos estudiados. La temperatura a la que se observa una mayor actividad tanto β -galactosidasa como β -fucosidasa es de 90°C, un dato que es congruente con la idea de que la enzima de mayor relevancia en la actividad de éstos extractos es la TTP0042, ya que para dicha enzima clonada en y expresada en *E. coli* se reportó como temperatura de actividad máxima los 88 °C⁷² y mostró mayor actividad fucosidasa que galactosidasa.

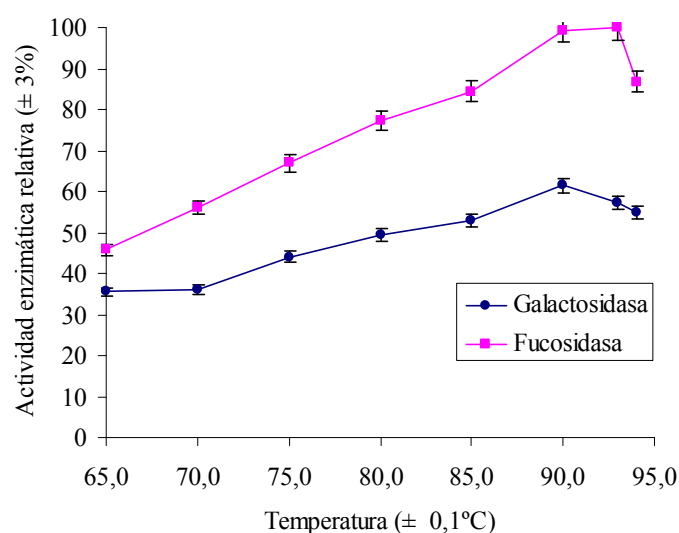


Figura 39. Efecto de la temperatura en la actividad enzimática de los extractos de HB27 inducidos, sobre los sustratos *p*NF- β -Gal (medido en fosfato de sodio 25 mM, pH 5,50) y *p*NF- β -Fuc (medido en fosfato de sodio 50 mM, pH 6,50) en un medio 1 mM de sustrato. El valor de actividad enzimática relativa se midió respecto al valor máximo determinado.

Estabilidad térmica

Considerando que la mayor actividad enzimática con los extractos celulares se obtiene a 90 °C, se decidió analizar la estabilidad térmica de éstos extractos a dicha temperatura en las condiciones óptimas previamente determinadas. Para esto se presenta la actividad relativa (referida a los máximos de cada una de las actividades enzimáticas estudiadas) en la figura 40.

Los resultados de estabilidad térmica muestran una ventaja sobre los resultados que Dion⁷² y colaboradores obtuvieron con la enzima TTP0042 en forma purificada. Éstos investigadores determinaron que la vida media de la enzima TTP0042 a 90°C es de 10 minutos, mientras que tanto con las actividad β -galactosidasa como β -fucosidasa de los extractos de HB27 su comportamiento muestra una vida media superior a las 2 horas y ligeramente inferior a las 3 horas. Recientemente Pérez¹³ encontró comportamientos similares con la enzima TTP0042 his₆tag en sus estudios, aumentando la estabilidad térmica de ésta enzima purificada en función del aumento de la concentración, estos hechos pueden sugerir un acoplamiento de varias unidades monoméricas dando lugar a estructuras multiméricas más estables.

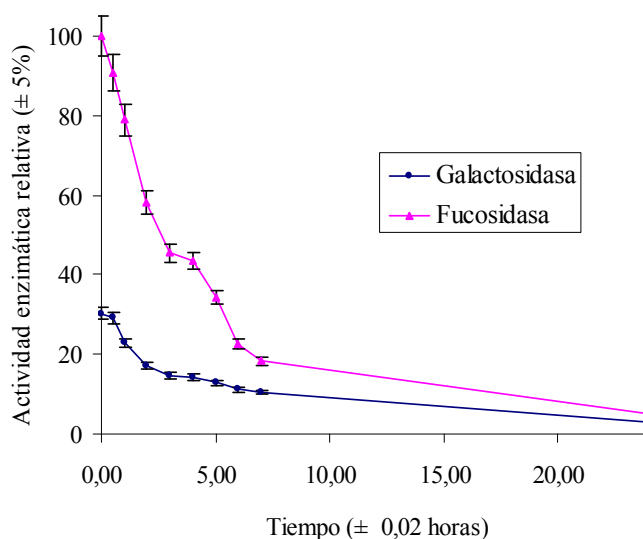


Figura 40. Estabilidad térmica de los extractos de HB27 inducidos a 90°C, sobre los sustratos *p*NF- β -Gal (medido en fosfato de sodio 25 mM, pH 5,50) y *p*NF- β -Fuc (medido en fosfato de sodio 50 mM, pH 6,50) en un medio 1 mM de sustrato. El valor de actividad enzimática relativa se midió respecto al valor máximo de cada actividad.

Constante de Michaelis-Menten

Los parámetros cinéticos de Michaelis-Menten normalmente están referidos a enzimas puras, sin embargo, la determinación de los mismos en extractos celulares puede aportar información sobre la contribución de una determinada enzima (como por ejemplo TTP0042) en la actividad catalítica de los mismos.

Considerando que la mayor actividad enzimática se obtiene a 90 °C con una estabilidad térmica relativamente alta, se decidió analizar el comportamiento cinético de los extractos celulares de HB27 inducido únicamente con *pNF-β-Gal* como sustrato, dado que para efectos de síntesis de oligosacáridos ésta es la sustancia de mayor interés por sus aplicaciones farmacológicas e inmunológicas^{1,192}.

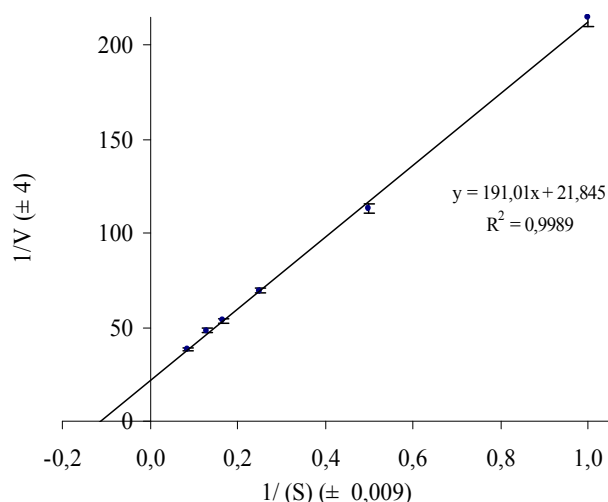


Figura 41. Gráfico de Lineweaver-Burk para los extractos celulares de HB27 inducido con celobiosa, realizado con *pNF-β-Gal* (1, 2, 4, 6, 8, y 12 mM) en medio tamponado de fosfato de sodio 25 mM, pH 5,50.

Los resultados obtenidos en los gráficos de doble inversa (Lineweaver-Burk, figura 41) muestran un comportamiento lineal en los extractos estudiados, pudiendo determinarse la constante de Michaelis (K_M) de 8,74 mM (*pNF-β-Gal*) y una velocidad máxima (V_{max}) de 3,78 $\mu\text{M/s}$ (0,0453 $\mu\text{mol/min}$). Dado que ésta técnica es propia de enzimas purificadas, el obtener una linealidad en los extractos, refuerza la idea de que existe una enzima que es la principal responsable de la actividad enzimática en éstos preparados.

Esta enzima podría ser la TTP0042 cuyo valor de K_M en presencia de pNF- β -Gal a 65°C es de 6,6 mM, este dato no se ha podido medir a 90°C por que la enzima pura tiende a inactivarse rápidamente por encima de 85°C.^{33, 164, 165}

Este valor de V_{max} es relativamente bajo si considerando valores descritos para otras β -galactosidasas comerciales como son, la β -galactosidasa de *E. coli* ó la de *Kluyieromyces fragilis*, obteniéndose valores de 19 μ M/s (5 veces más rápida) y 11,3 μ M/s (3 veces más rápida) respectivamente, medidos en tampones de imidazol a pH 6,50.¹²³ La diferencia fundamental de estas enzimas con respecto a nuestro preparado celular es la pureza, ya que estas enzimas poseen mayor pureza que los extractos utilizados en nuestro caso, por lo que es factible pensar que el respectivo proceso de purificación puede mejorar éstos resultados. La enzima TTP0042 purificada por Dion⁷² mostró una K_M de 6,6 mM a 65°C y pH 7,0 (dicho estudio no menciona el valor de V_{max}), este valor no difiere en mucho de la K_M obtenida en los extractos celulares de HB27.

Analizando el genoma de la cepa HB27,⁷³ sabemos que existen otras enzimas glicosidasas con actividad hidrolítica, siendo la enzima TTP0222 la que luego de TTP0042 posee mayor actividad de tipo β -galactosidasa, según lo determinó Pérez.¹³ Estas enzimas, por tanto, están presentes en los extractos celulares de *T. thermophilus* HB27 y por ello afectarían los valores cinéticos propios de la TTP0042, generando un promedio de actividad para cada concentración de sustrato, resultando en la gráfica y valores aquí reportados.

4.2.1.2. Purificación de enzimas recombinantes de HB27 expresadas en *E. coli*

Se produjeron enzimas recombinantes siguiendo los protocolos descritos en el punto 3.4.1.3. Se emplearon dos enzimas recombinantes de *T. thermophilus* clonadas y expresadas en *E. coli*: TTP0042 y TTP0222, ambas enzimas poseen un extremo polipeptídico de veinte aminoácidos que posee 6 histidinas (His₆tag). Se utilizó además una enzima clonada y expresada en *T. thermophilus* HB27Nar: TTP0042 His₆tag. Todas las proteínas se modificaron por adición de una cola de seis histidinas incluidas en un brazo extensor de 19 aminoácidos unidos por el amino terminal de la enzima.

Las enzimas recombinantes expresadas en *E. coli* fueron: TTP0042 his₆tag y TTTP0222 his₆tag. En estos casos la biología molecular actual aportó dos elementos de gran importancia que facilitaron el proceso de purificación:

a) La expresión de una enzima termófila en un organismo mesófilo, esto permite precipitar una gran cantidad de proteínas de *E. coli* que a 70 °C desnaturalizan y luego son eliminadas por centrifugación, tal y como se ha repetido en numerosos estudios sobre este tema^{110, 112-114, 120} algunos de los cuales no realizan una purificación posterior y utilizan este extracto como biocatalizador para reacciones de síntesis de glicoconjugados^{124, 174}, ésta aproximación es sumamente válida dado que probablemente la única enzima activa en el extracto será la proteína de origen termófilo, mientras que la enzima termófila expresada no precipitará, adicionalmente el proceso de desnaturalización por calor remueve numerosas proteínas, hecho que se observa en los procesos de electroforesis.⁷² Pese a la clara conveniencia de este paso en la purificación se debe tener en cuenta que la actividad de la enzima puede disminuir producto del desgaste térmico al que se somete, sin embargo el balance general tiende a favorecer el uso de este paso en la purificación de la proteína.

b) La presencia de un péptido adicional rico en histidina en el extremo amino de la proteína que permite su aislamiento utilizando la técnica de cromatografía de afinidad con metales quelatados, la cual fue reportada por primera vez en 1975 por Porath y colaboradores,²⁸⁸ estando comprobada su baja actividad inmunogénica²⁴⁹ y pocos o nulos efectos en las propiedades de las proteínas recombinantes que la utilizan⁸². A la fecha se han purificado β -galactosidasas recombinantes de origen termófilo a las que se les ha añadido este extremo terminal de histidinas para facilitar su purificación luego de la precipitación térmica las proteínas de *E. coli*.^{163, 172} Los resultados obtenidos en los procesos de purificación con las proteínas recombinantes (his₆tag) de HB27 expresadas en *E. coli* se muestran a continuación.

Purificación de la enzima TTP0042 his₆tag

La enzima TTP0042 his₆tag se sometió a tres procedimientos de purificación: eliminación de precipitados celulares por centrifugación, eliminación de proteínas por desnaturalización a 70 °C y centrifugación, y finalmente purificación por cromatografía

de afinidad Ni^{2+} -agarosa. La figura 42 muestra el perfil de elución a 280 nm de la columna de Ni^{2+} -agarosa con el extracto de *E. coli* clarificado (luego de desnaturalizar a 80°C por 40 minutos y centrifugar). De 0 a 20 minutos se equilibra la columna con tampón de adhesión (ver punto 3.2.5), luego de 20 a 66 minutos las proteínas se cargan en la columna con el mismo tampón y se hacen pasar por la columna lentamente (a un flujo de 0,50 mL/min) para garantizar una adecuada fijación de la proteína recombinante mediante las histidinas de la enzima y el níquel (II) de la columna.

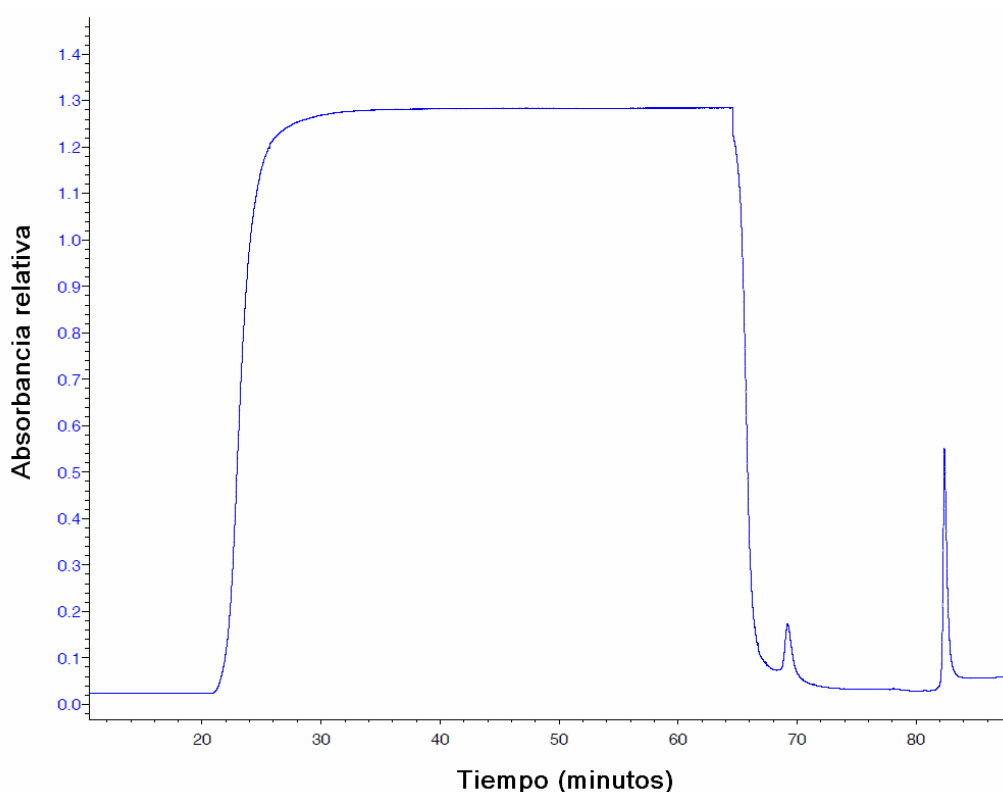


Figura 42. Perfil de elución (utilizando el *Biologic LP*) de proteínas en la columna de Ni^{2+} -agarosa leídas a 280 nm, para extractos de *E. coli* con la enzima recombinante TTP0042, luego de ser calentados a 80°C y centrifugados. La proteína TTP0042 eluye entre los 80 y 86 minutos del cromatograma.

Desde los 66 hasta los 78 minutos, la columna se lava con un tampón de lavado que se encuentra ligeramente enriquecido en imidazol (10 mM) para eliminar proteínas que se han adherido a la columna por interacciones debidas posiblemente a histidinas adyacentes en su estructura nativa, una pequeña parte de la enzima TTP0042 también eluye en esta zona. Finalmente desde los 78 hasta los 86 minutos se hace pasar tampón de elución que

posee una alta concentración de imidazol (500 mM) desprendiendo la enzima de la columna.

La figura 43 muestra el proceso de purificación seguido mediante electroforesis en condiciones desnaturizantes, la enzima purificada muestra un alto grado de pureza por la eliminación de proteínas de *E. coli* mediante desnaturalización térmica a 70°C. La elución en cromatografía de afinidad Ni^{2+} -agarosa mejora notablemente la pureza de la enzima. Durante la purificación se ha contabilizado una eliminación de hasta un 80% de las proteínas presentes en el extracto clarificado (B) luego de someterse a calentamiento a 80°C durante 40 minutos, el restante 20% de proteínas presentes en el medio acuoso clarificado se purifican por cromatografía de afinidad obteniéndose una altísima pureza.

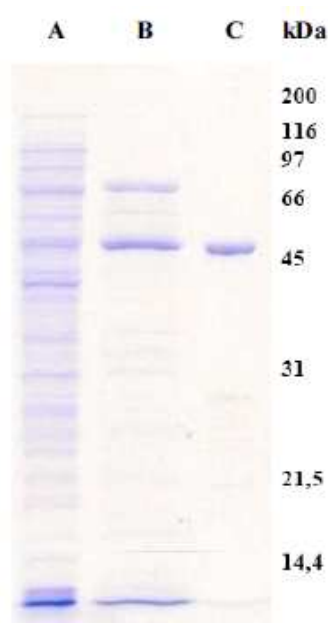


Figura 43. SDS-PAGE (12,5% acrilamida) para las fracciones obtenidas en el proceso de purificación de la enzima TTP0042 his₆tag (49 kDa) expresada en *E. coli*. A) Extracto crudo; B) Extracto clarificado por calentamiento a 80 °C; C) Proteína obtenida luego de la cromatografía de afinidad (Ni^{2+} -agarosa).

Finalmente, la tabla 30 presenta un resumen general del proceso de purificación de la enzima. De dicha tabla se puede apreciar que la proteína se purifica con un factor de 40 veces respecto al extracto crudo inicial. La enzima purificada representa un rendimiento del 39% de la actividad total determinada en los extractos crudos de *E. coli*, mientras que respecto al total de proteínas presentes en dicho extracto, la enzima purificada equivale al 0,98%. Además, la actividad enzimática pasa de ser 4,15 U/mg hasta 165 U/mg luego del proceso de purificación.

Tabla 30. Resumen del proceso de purificación de la proteína TTP0042 his₆tag expresada en *E. coli*. (la actividad enzimática está medida en un medio 5 mM en pNF-β-Gal en fosfato de sodio pH 7,00 50 mM a 80°C).

Paso de purificación	Proteínas totales (mg)	Rendimiento de proteínas (%)	Actividad específica (U/mg)	Factor de purificación
Centrifugación del extracto crudo	1523	100	4,15	1
Precipitación a 70 °C y centrifugación	792	52	6,88	1,7
Cromatografía de afinidad Ni ²⁺ -agarosa	15,0	0,98	165	40

Purificación de la enzima TTP0222 his₆tag

La enzima TTP0222 his₆tag se sometió a los mismos procedimientos de purificación que la enzima TTP0042 his₆tag descrita en el apartado anterior. La tabla 31 muestra los rendimientos obtenidos en el proceso de purificación de la enzima, los cuales son bastante similares a los obtenidos con la enzima TTP0042 his₆tag, lo que sugiere que los promotores del gen y el proceso de inducción son bastante reproducibles en las condiciones de trabajo utilizadas con *E. coli*.

Tabla 31. Resumen del proceso de purificación de la proteína TTP0222 his₆tag expresada en *E. coli*. (la actividad enzimática está medida en un medio 5 mM en pNF-β-Gal en fosfato de sodio pH 7,00 50 mM a 80°C).

Paso de purificación	Proteínas totales (mg)	Rendimiento de proteínas (%)	Actividad específica (U/mg)	Factor de purificación
Centrifugación del extracto crudo	129	100	0,023	1
Precipitación a 70 °C y centrifugación	47	36	0,041	1,8
Cromatografía de afinidad Ni ²⁺ -agarosa	1,3	1	1,011	44

El peso molecular estimado de la proteína TTP0222 es de 77,5 kDa en condiciones nativas,⁷³ sin embargo este valor es ligeramente mayor debido a la cola de histidinas adicionada a la misma. En la figura 44 se aprecia claramente la mayor afinidad de ésta proteína hacia la columna de Ni²⁺-agarosa, aunque se aprecia poca sobreexpresión de la misma en el extracto celular de *E. coli*.

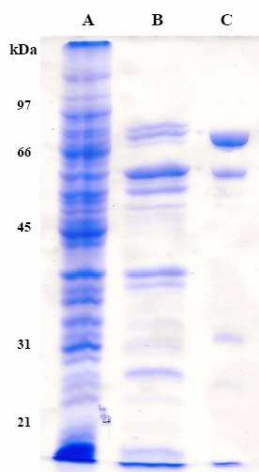


Figura 44. SDS-PAGE (10% acrilamida) para las fracciones obtenidas en el proceso de purificación de la enzima TTP0222 his₆tag (aprox. 78 kDa). A) Extracto crudo centrifugado; B) Extracto clarificado por calentamiento a 70 °C y centrifugación; C) Proteína obtenida luego de la cromatografía de afinidad (Ni²⁺-agarosa).

Por otra parte, esta enzima presentó una actividad específica muy baja: 1,01 U/mg a 80°C, utilizando tampón fosfato de sodio (pH 7,0, 50 mM) como medio de reacción y 5 mM de *p*NF-β-Gal como sustrato. Este valor de actividad enzimática es más de 160 veces inferior al obtenido con la enzima TTP0042 his₆tag purificada en las mismas condiciones y cerca de dos veces menor que el presentado en los extractos celulares de HB27 inducido con celobiosa (80°C). Las razones por la que se obtiene un valor tan bajo de actividad para esta enzima podrían deberse a una baja estabilidad térmica que se evidenciaría por la pérdida de actividad tras la desnaturalización de proteínas de *E. coli* a 70°C durante el proceso de purificación. Además también se observa la presencia de otras proteínas secundarias en el gel de electroforesis (Figura 44). Pese a todas las consideraciones realizadas, la actividad específica obtenida para la enzima TTP0222 his₆tag es tan baja que se considera poco viable su uso como biocatalizador.

4.2.2.2. Purificación de TTP0042 his₆tag expresadas en *T. thermophilus* HB27Nar

En la purificación de la enzima TTP0042 his₆tag expresada en HB27Nar se obtuvo una actividad específica de 248 U/mg, mientras que la misma proteína obtenida de los extractos de *E. coli* posee una actividad de 165 U/mg, ambas actividades fueron medidas a 80°C en 5 mM de sustrato (*p*NF-β-Gal) y tampón fosfato de sodio 50 mM, pH 7,0. La principal diferencia entre ambas proteínas, radica en el hospedero sobre el que se expresa, la proteína expresada en *E. coli* realiza su plegamiento en condiciones mesófilas a 37° mientras que la enzima clonada en HB27Nar realiza su plegamiento en condiciones

óptimas de su naturaleza termófila, constituyendo una ventaja a considerar respecto a su par mesófilo.

Un hecho similar ha sido descrito por Yoo y colaboradores,²⁸⁹ quienes purificaron una β -glicosidasa (con actividad sobre varios enlaces glicosídicos β -gal > β -fuc > β -gluc) en la especie *Thermus caldophilus* GK24 mediante procesos cromatográficos y lograron aislar una proteína de 49 kDa con una actividad específica de 165 U/mg, utilizando como medio de reacción tampón fosfato de sodio 20 mM a pH 6,00 y 75°C, y como sustrato 5 mM de *p*NF- β -Gal, aunque también se utilizaron otros *p*-nitrofenil glicósidos (Fuc, Glc y Xil). Un año más tarde se expresó la misma enzima en *E. coli* y se purificó mediante desnaturalización por calentamiento (40 min, 80°C) y posterior tratamiento mediante una cromatografía de exclusión molecular. Mediante este proceso de purificación se obtuvo una actividad específica de 83 U/mg bajo las mismas condiciones experimentales, siendo la proteína purificada similar en un 92% a la TTP0042 de HB27.⁷⁹ Estos resultados indican que se ha obtenido una actividad casi dos veces más alta para proteínas de termófilas que han sido expresadas en un hospedero termófilo respecto a su par en *E. coli*.

Tabla 32. Resumen del proceso de purificación de la proteína TTP0042 his₆tag expresada en *Thermus thermophilus* HB27Nar. (la actividad enzimática está medida en un medio 5 mM en *p*NF- β -Gal en fosfato de sodio pH 7,00 50 mM a 80°C).

Paso de purificación	Proteínas totales (mg)	Rendimiento de proteínas (%)	Actividad específica (U/mg)	Factor de purificación
Extracto crudo	40,5	100	5,64	1,0
Centrifugación del extracto crudo	24,9	61	12,4	2,2
Cromatografía de afinidad Ni ²⁺ -agarosa	0,034	0,08	248	44

Respecto a los datos obtenidos para la enzima en el proceso de purificación (tabla 32), se puede observar que la enzima TTP0042 his₆tag expresada en HB27Nar da resultados sumamente bajos en cuanto a la cantidad proteína purificada (probablemente vinculados al tipo de promotor genético y la respuesta de éste en la cepa HB27Nar). Al comparar el rendimiento proteico obtenido en esta cepa (0,08%) respecto el total con el mismo

rendimiento obtenido por expresión en *E. coli* (0,98), se obtiene un rendimiento 12 veces mejor al expresar la proteína en la bacteria mesófila.

Finalmente, la electroforesis (SDS-PAGE, figura 45) no muestra una sobreexpresión de la enzima, aunque sí muestra una eficiente purificación de la misma con pequeñas contaminaciones debido a otras proteínas presentes en los extractos celulares de HB27Pnar que poseen cierta afinidad por el níquel (II) y por ello no separadas por la columna de afinidad.

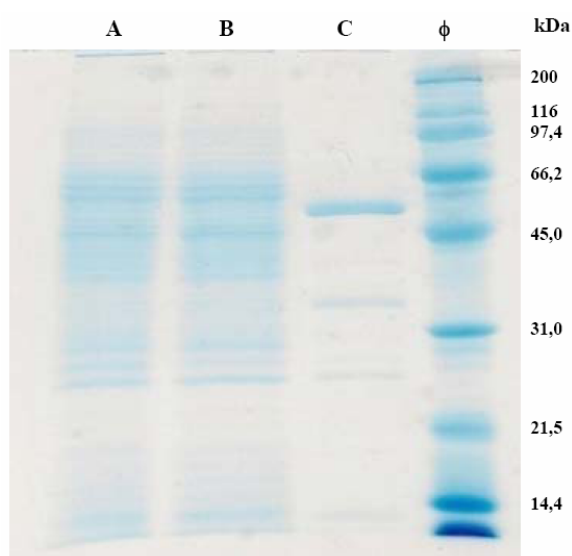


Figura 45. SDS-PAGE (12,5% acrilamida) para las fracciones obtenidas en el proceso de purificación de la enzima TTP0042 his₆tag (49 kDa) expresada en *Thermus thermophilus* HB27Nar. A) Extracto crudo; B) Extracto crudo centrifugado; C) Proteína obtenida luego de la cromatografía de afinidad (Ni²⁺-agarosa); ϕ) Marcadores de peso molecular.

4.2.2.3. Caracterización de la enzima TTP0042 his₆tag (expresada en *E. coli*)

En primer lugar se llevó a cabo un estudio para determinar las condiciones óptimas de pH y medio de reacción a la hora de determinar la actividad específica de la enzima TTP0042 his₆tag, con la finalidad de utilizar dicha información en los pasos posteriores.

pH óptimo

Se estudió el pH óptimo de la enzima recombinante TTP0042 His₆tag midiendo su actividad enzimática a diferentes valores de pH (desde 4,0 hasta 8,0) bajo la metodología descrita en el punto 3.4.1.4. El resultado fue un amplio margen de trabajo (pH desde 5,00 – 6,50) que supera incluso el margen de pH propio de los extractos celulares de HB27

(Figura 46). Este dato guarda pocas diferencias con los datos encontrados originalmente por Dion y colaboradores⁷² quienes también encontraron una mayor actividad enzimática hacia valores de pH ligeramente ácidos. Para efectos de trabajo con ésta enzima se decidió utilizar el valor de pH 6,0 como como valor óptimo de trabajo.

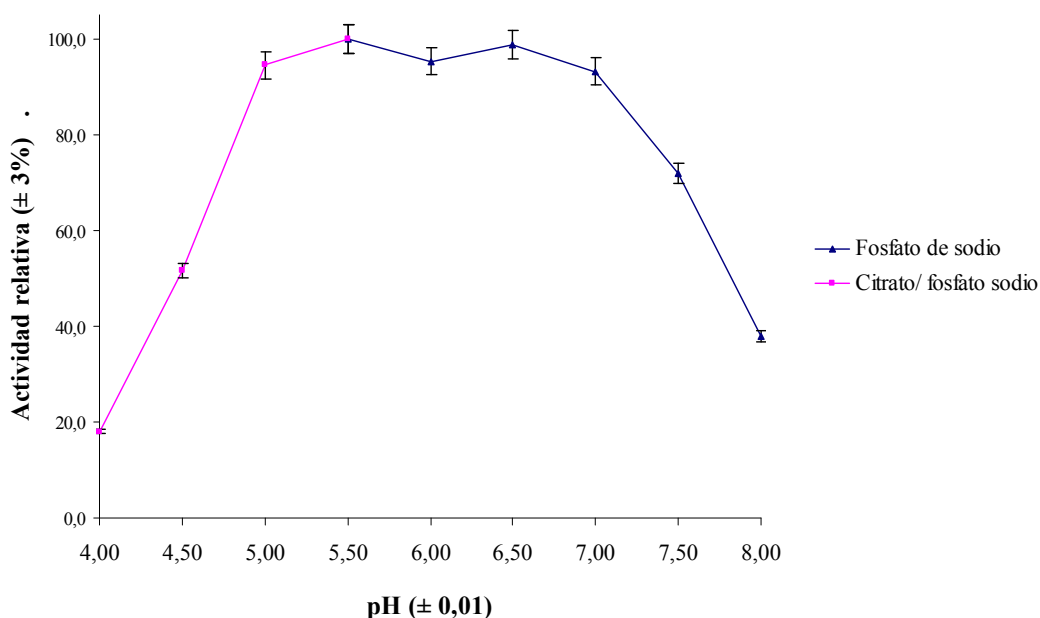


Figura 46. Efecto del pH en la actividad enzimática de la enzima TTP0042 his₆tag expresada en *E. coli* sobre el sustrato *p*NF-β-Gal (1 mM) a 80°C. El pH se ajustó con los tampones citrato/ fosfato de sodio y fosfato de sodio de concentración 50 mM. Las actividades están referidas en términos relativos al valor máximo determinado.

Tampón óptimo

Los resultados de la actividad enzimática obtenida en los diferentes tampones utilizados se muestran en la tabla 33. Como puede observarse en dicha tabla, los tampones utilizados permiten obtener más de un 90% de actividad relativa de la enzima, siendo que el tampón fosfato de sodio es el más adecuado para utilizar con ésta enzima, un hecho que es concordante con los resultados obtenidos en los extractos celulares de HB27 inducido, lo que muestra que la enzima TTP0042 guarda un papel de suma importancia en el comportamiento hidrolítico de tales extractos.

Tabla 33. Dependencia de la actividad β -galactosidasa de la enzima TTP0042 his₆tag expresada en *E. coli* en función del tipo de tampón, a 80°C, 1 mM en sustrato y 50 mM de tampón.

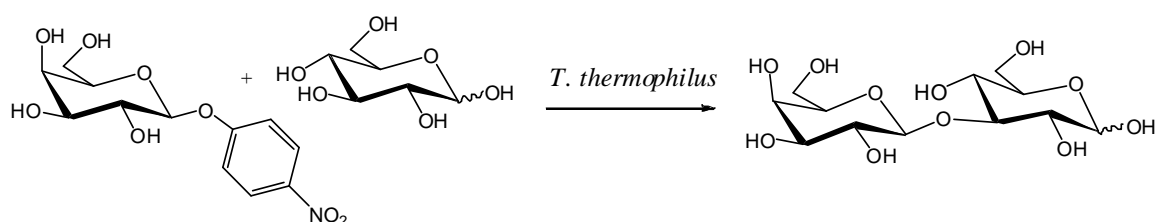
Tampón	Actividad relativa (pH 6.00)
Ácido cítrico / Citrato de sodio	(95 ± 3)%
Citrato / Fosfato de sodio	(91 ± 3)%
Fosfato de sodio	(100 ± 3)%
MES	(93 ± 3)%

4.2.2. Síntesis de disacáridos utilizando biocatalizadores de origen termófilo

4.2.2.1. Reacciones de transglicosidación con extractos inducidos de HB27

Utilizando las condiciones de reacción descritas en el punto 3.4.2.1 se analizaron los diferentes aceptores que pueden reconocer estos extractos con resultados cuantificables mediante HPLC-ELSD, UV y DC. Los detectores de U.V y DC se emplearon en este caso por que existen antecedentes⁸³ que muestran que la enzima TTP0042 de HB27 tiende a autocondensar el *p*NF- β -Gal dando lugar a dos moléculas de condensado: Gal- β [1→3]-Gal- β -*p*NF (~42%), Gal- β [1→6]-Gal- β -*p*NF (~9%), éstas moléculas absorben a 317 nm (debido al *p*NF) lo que justifica el uso de un detector ultravioleta y por su centro quiral próximo al fenilo pueden ser detectadas por dicroísmo circular.

En la bibliografía se ha descrito que la actividad sintética de la enzima TTP0042 muestra una altísima preferencia por los enlaces tipo β (1→3) y levemente por las uniones β (1→6).^{115, 121, 122} Sin embargo, recientemente, Tran y colaboradores²⁸⁴ determinaron que la misma enzima en presencia del grupo 2-acetamido de la molécula del GlcNAc, cambia su configuración de entrada al centro activo de la enzima, favoreciendo enlaces del tipo β [1→4]. Por ello la síntesis de galactósidos con este tipo de biocatalizador puede variar en función del tipo de aceptor utilizado. El esquema 20, ilustra la reacción de transglicosilación para un donador de *p*NF- β -Gal y un aceptor de glucosa, obteniéndose el correspondiente disacárido con enlaces β (1→3).



Esquema 20. Síntesis de un galactósido (Gal-β[1→3]Glc) utilizando *pNF-β-Gal* como donador y Glc como aceptor catalizada por los extractos celulares de *T. thermophilus* HB27. La regioselectividad de la principal enzima de este organismo (TTP0042)²⁶² favorece la síntesis de enlaces β[1→3] para la mayoría de los azúcares,⁸³ excepto cuando están *N*-acetilados, en cuyo caso se favorecen enlaces β[1→4].²⁸⁴

Screening de aceptores en reacciones de transglicosidación empleando extractos celulares de HB27 inducido con celobiosa.

Las reacciones de transglicosidación estudiadas se realizaron utilizando *pNF-β-Gal* como donador. Los aceptores utilizados fueron: *pNF-β-Gal*, Gal, Man, Fuc, Glc, GlcNH₂.HCl, GalNH₂.HCl, GlcNAc y GalNAc (Tabla 34). De dicha tabla se puede apreciar que los extractos celulares actúan como biocatalizadores para la síntesis de β-galactósidos con un extremo de GlcNAc o GlcNH₂. Pero no reconocen la mayoría de los aceptores, dando como resultado un aumento de la hidrólisis.

Tabla 34. Resultados de las reacciones de transglicosidación (%) utilizando *pNF-β-Gal* con extractos celulares de HB27 (inducido con celobiosa) en tampón fosfato de sodio pH 5,50 25 mM a 80 °C. Los porcentajes fueron calculados con base en las áreas obtenidas mediante HPLC-ELSD tras 3 horas de reacción.

Aceptor	Autocondensado Galβ[1→3]Gal β- <i>pNP</i>	Autocondensado Galβ[1→6]Gal-β- <i>pNP</i>	Hidrólisis (Galactosa)	Disacárido β[1→3]	Disacárido β[1→6]
<i>pNF-β-Gal</i>	1	96	3	--	--
Gal	--	--	100	--	--
Man	--	--	100	--	--
Fuc	37	--	63	--	--
Glc	--	--	100	--	--
GlcNH ₂ .HCl	19	--	42	39	--
GalNH ₂ .HCl	--	45	55	--	--
GlcNAc	0	0	91	9	--
GalNAc	--	--	100	--	--

La Tabla 34 muestra que en algunos casos se puede apreciar una ausencia casi total del producto de autocondensación del donador Gal- β [1 \rightarrow 3]-Gal- β -pNP y Gal- β [1 \rightarrow 6]-Gal- β -pNP, lo que en principio representa una primera ventaja respecto a los resultados encontrados por Chiffoleau-Giraud y colaboradores quienes han trabajado con la enzima recombinante TTP0042 y han encontrado altos porcentajes de autocondensación del donador.⁸³ De los aceptores reconocidos por la enzima, el disacárido de mayor importancia en una eventual síntesis a mayor escala sería el Gal- β [1 \rightarrow 4]-GlcNAc, ya que es un precursor en la síntesis del antígeno H-II,²⁹⁰ así como otros antígenos asociados a los tumores,⁴⁻⁸ además esta estructura forma parte de numerosos oligosacáridos presentes en glicoproteínas y glicolípidos.³²⁹⁻³³¹

4.2.2.2. Reacciones de transglicosidación con extractos celulares del mutante T42kat

Para analizar el papel de la enzima TTP0042 en los extractos celulares de HB27 y propiamente en las reacciones de transglicosidación, se utilizó el mutante T42kat, que posee el mismo proteoma de HB27 con una modificación en la proteína TTP0042 que ha sido modificada genéticamente en el grupo del profesor Berenguer, para que se exprese en forma atrofiada. Previamente a las reacciones de transglicosidación, se determinó que la actividad enzimática específica a 80°C en tampón fosfato de sodio pH 5,50 25 mM para este mutante presentó un 8% de la actividad respecto a los extractos de HB27, habiendo sido ambas cepas cultivadas y tratadas bajo las mismas condiciones. Este dato, aunado a las anteriores evidencias de comportamiento bioquímico entre los extractos celulares de *T. thermophilus* HB27 y su enzima purificada TTP0042, comprueban la gran relevancia de dicha enzima en la actividad hidrolítica de los extractos celulares de *T. thermophilus* inducido con celobiosa, denotándola como la β -galactosidasa más importante de la cepa HB27.²⁶²

Por otro lado, de cara a la actividad experimental, esto ocasionó que las reacciones de transglicosidación no se pudieran realizar con 9 unidades enzimáticas y en su lugar se tuvo que emplear la misma cantidad de proteína que en los extractos celulares liofilizados de HB27 (43,3 mg por cada reacción). Las reacciones de transglicosidación estudiadas se realizaron utilizando pNF- β -Gal como donador y pNF- β -Gal (autocondensación), GlcNH₂.HCl, GalNH₂.HCl, GlcNAc y GalNAc como aceptores, los resultados de este

ensayo se muestran en la siguiente tabla (Tabla 35). Los resultados de este estudio mostraron que el mutante T42Kat no sintetiza ningún disacárido, incluso con aquellos aceptores en los que la cepa original (HB27) si es capaz de sintetizarlos (GlcNAc y GlcNH₂). Lo que demuestra el papel fundamental de la enzima TTP0042 (ausente en la cepa T42Kat) en la síntesis de disacáridos.

Tabla 35. Síntesis de glicósidos (%) utilizando *p*NF- β -Gal con extractos celulares de la cepa mutante T42kat (cultivado con celobiosa) en fosfato de sodio pH 5,50 25 mM a 80°C. Los porcentajes fueron calculados con base en las áreas obtenidas mediante HPLC-ELSD tras 3 horas de reacción.

Aceptor	Autocondensado Gal β [1 \rightarrow 3]Gal β - <i>p</i> NP	Autocondensado Gal β [1 \rightarrow 6]Gal- β - <i>p</i> NP	Hidrólisis (galactosa)	Disacárido β [1 \rightarrow 3]	Disacárido β [1 \rightarrow 6]
<i>p</i> NP- β -Gal	20,9	32,6	46,5	--	--
GlcNH ₂ .HCl	55,8	19,5	24,7	--	--
GlcNAc	2,5	58,2	39,3	--	--
GalNH ₂ .HCl	55,2	4,4	40,4	--	--
GalNAc	77,7	--	22,3	--	--

Resulta importante mencionar que la ausencia de la enzima TTP0042 en los extractos de ésta cepa, no se evidencie en la síntesis de los productos de autocondensación. En primera instancia se esperaba obtener una nula síntesis de disacárido, hecho que fue corroborado y lo que confirma que la enzima TTP0042 es la principal responsable de actividad sintética (en lo referente a disacáridos) en éstos extractos, sin embargo la reacción de autocondensación se ve favorecida en este caso, lo que indica que otras glicosidasas presentes en los extractos celulares pueden formar productos de autocondensación. Los resultados obtenidos evidencian una mayor tendencia a la síntesis del producto de autocondensación, menor tendencia a la hidrólisis y nula actividad sintética.

4.2.2.3. Reacciones de transglicosilación catalizadas por TTP0042 expresada en *E. coli*.

Utilizando las condiciones descritas en el punto 3.4.2.2 se efectuaron reacciones de transglicosidación con la enzima TTP0042 his₆tag expresada en *E. coli*. La literatura consultada refiere una clara actividad sintética hacia la síntesis de galactósidos con enlaces β [1 \rightarrow 3] como producto mayoritario (Gal- β -(1 \rightarrow 3)-Gal-O-Me, Gal- β -(1 \rightarrow 3)-

Gal-O-*o*NF, Gal- β -(1 \rightarrow 3)-Glc-O-*o*Ar, entre otros) y en menor proporción, galactósidos con configuración β [1 \rightarrow 6].^{75, 117, 323} Sin embargo, un estudio publicado en años recientes por Tran y col.²⁸⁴ demostró que utilizando GlcNAc como aceptor, la enzima cambia su regioselectividad hacia la síntesis de discáridos con enlaces β [1 \rightarrow 4] (en este caso se sintetizó Gal- β -(1 \rightarrow 4)- β -GlcNAc- β -*p*NF a partir de *p*NF- β -Gal y GlcNAc- β -*p*NF) debido a problemas de acoplamiento de la molécula de aceptor en el centro activo de la misma. Por ello, la enzima no puede orientar adecuadamente el aceptor para sintetizar enlaces β (1 \rightarrow 3) y en su lugar da lugar a la formación de enlaces tipo β (1 \rightarrow 4) cuando existe el grupo 2-acetamido en el azúcar donador (Figura 47).

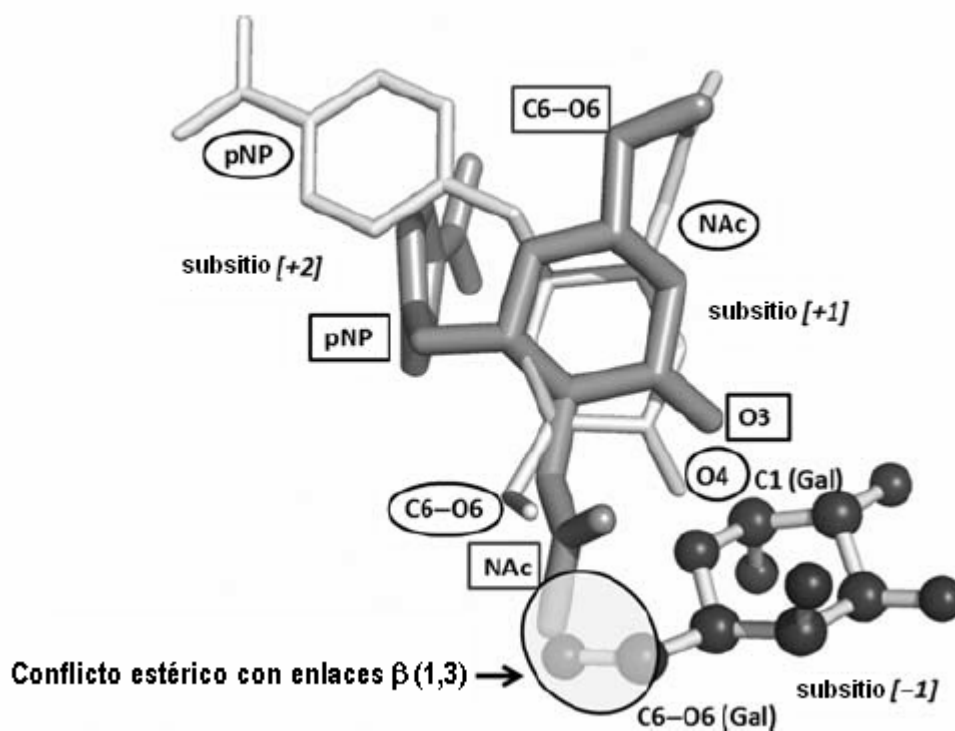


Figura 47. Solución de docking publicada por Tran y colaboradores,²⁸⁴ en la que explican el conflicto entre enlaces β (1 \rightarrow 4) y β (1 \rightarrow 3) en el centro activo de la enzima TTP0042, cuando se utiliza *p*NF-GlcNAc como donador. La estructura en barras gruesas y la información dentro de rectángulos corresponden a la formación de un enlace β (1 \rightarrow 3), mientras que las barras delgadas y la información dentro de círculos corresponden a la formación del enlace β (1 \rightarrow 4) (Imagen modificada de la original de Tran y col.).²⁸⁴

Screening de aceptores con TTP0042 his₆tag expresada en *E. coli*

Se realizó un screening de posibles aceptores, para analizar la capacidad sintética de la enzima TTP0042 (expresada en *E. coli*) como catalizador en la síntesis de disacáridos. Las reacciones de transglicosidación se realizaron utilizando *p*NF- β -Gal como donador. Los aceptores utilizados fueron: *p*NF- β -Gal, Gal, Man, Fuc, Glc, GlcNH₂.HCl, GalNH₂.HCl, GlcNAc y GalNAc.

Los resultados de este trabajo (Tabla 36) muestran un reconocimiento de aceptores muy similar al alcanzado por los extractos celulares de HB27 con la desventaja de que las reacciones de autocondensación se ven claramente favorecidas, tal y como lo predice la literatura consultada.⁸³ Por otra parte, de las reacciones estudiadas se favorece la síntesis del producto Gal β [1 \rightarrow 4]GlcNAc, que como se ha mencionado anteriormente es un precursor de numerosos antígenos asociados a los tumores,⁴⁻⁸ y por sus numerosas vinculaciones en glicoproteínas y glicolípidos,²⁹⁴⁻²⁹⁶ por ello se considera de gran importancia estudiar las condiciones de reacción como una alternativa para obtenerlo con mayores rendimientos.

Tabla 36. Resultados de las reacciones de transglicosidación (%) utilizando *p*NF- β -Gal con la enzima TTP0042 his₆tag (*E. coli*) en tampón fosfato de sodio pH 6,0, 50 mM a 65°C. Los porcentajes fueron calculados con base en las áreas obtenidas mediante HPLC-ELSD tras 3 horas de reacción.

Aceptor	Autocondensado Gal β [1 \rightarrow 3]Gal β - <i>p</i> NP	Autocondensado Gal β [1 \rightarrow 6]Gal- β - <i>p</i> NP	Hidrólisis (galactosa)	Disacárido β [1 \rightarrow 3]	Disacárido β [1 \rightarrow 6]
<i>p</i> NF- β -Gal	78,3	21,7	--	--	--
Gal	90,6	9,4	--	--	--
Man	90,6	9,4	--	--	--
Fuc	--	--	100	--	--
Glc	73,6	7,1	--	--	19,3
GlcNH ₂ .HCl	68,5	6,6	--	6,7	18,2
GalNH ₂ .HCl	91,8	8,2	--	--	--
GlcNAc	80,0	7,7	--	12,3	--
GalNAc	77,2	22,8	--	--	--

4.2.2.4. Reacciones de transglicosilación catalizadas por TTP0042 expresada en HB27Nar

Con el fin de comprobar la influencia del organismo productor en la reactividad de la enzima recombinante, se expresó la enzima TTP0042 his₆tag en HB27Nar. El screening de aceptores se realizó con los azúcares de mayor relevancia ante una eventual síntesis de disacáridos, por lo que se emplearon: *p*NF-β-Gal, GlcNH₂.HCl, GalNH₂.HCl, GlcNAc y GalNAc, en las mismas condiciones utilizadas en el screening de la enzima expresada en *E. coli*. Los resultados de éste trabajo se muestran en la tabla 37. Nuevamente el disacárido favorecido es al parecer Gal β(1→4) GlcNAc. A juzgar por los rendimientos, se puede concluir que independientemente del organismo utilizado para producir la enzima, ésta se puede utilizar en las condiciones propuestas en este trabajo con resultados claramente reproducibles.

Tabla 37. Resultados de las reacciones de transglicosidación (%) utilizando *p*NF-β-Gal con la enzima TTP0042 his₆tag (expresada en *T. thermophilus* HB27Nar) en tampón fosfato de sodio pH 6,00 50 mM a 65°C. Los porcentajes fueron calculados con base en las áreas obtenidas mediante HPLC-ELSD, tras 3 horas de reacción.

Aceptor	Autocondensado Galβ[1→3]Gal β- <i>p</i> NP	Autocondensado Galβ[1→6]Gal-β- <i>p</i> NP	Hidrólisis (galactosa)	Galβ[1→4]GlcNAc	Galβ[1→6]GlcNAc
<i>p</i> NF-β-Gal	88,1	11,9	--	--	--
GlcNH ₂ .HCl	78,2	3,2	18,5	--	--
GlcNAc	79,5	3,6	--	16,9	--
GalNH ₂ .HCl	86,2	4,2	9,5	--	--
GalNAc	77,5	21,5	1,0	--	--

En este estudio, se encuentra de nuevo una alta tendencia de la enzima hacia las reacciones de autocondensación del donador, predominantemente Galβ(1→3)Gal-β-*p*NP y en menor cantidad Galβ(1→6)Gal-β-*p*NP. Sin embargo, la síntesis del disacárido de mayor interés Gal β(1→4) GlcNAc resulta poco favorecida bajo las condiciones de trabajo utilizadas.

4.2.2.5. Síntesis con la enzima TTP0222 expresada en *E. coli*

Finalmente, con la idea de evaluar el papel de la segunda β-galactosidasa más activa presente en el proteoma de HB27 de la que se tiene constancia,¹³ se realizó una reacción

de transglicosidación con la enzima TTP0222 (his₆tag). Dada la reducida actividad para esta enzima, se realizó una sola reacción con los sustratos de mayor interés ante una eventual síntesis, siendo éstos: *p*NF- β -Gal y GlcNAc, en las condiciones descritas en el punto 3.4.2. Los resultados obtenidos en este proceso se detallan en la tabla 38.

Tabla 38. Resultados de la reacción de transglicosidación (%) utilizando *p*NF- β -Gal y GlcNAc con la enzima TTP0222 his₆tag (expresada en *E. coli*) en medio tamponado con fosfato de sodio pH 6,0, 50 mM a 65°C. Los porcentajes fueron calculados con base en las áreas obtenidas mediante HPLC-ELSD tras 3 horas de reacción.

Aceptor	Autocondensado Gal β [1→3]Gal β - <i>p</i> NP	Autocondensado Gal β [1→6]Gal- β - <i>p</i> NP	Hidrólisis (galactosa)	Gal β [1→4]GlcNAc	Gal β [1→6]GlcNAc
Tampón	76	4	--	20	--

La síntesis de disacárido que se obtiene con ésta enzima alcanza rendimientos similares a los presentados la enzima TTP0042 bajo las mismas condiciones pero con el agravante de que su expresión es menor y su actividad es muy baja, por lo que se requieren grandes cantidades de cultivos para obtener enzima purificada suficiente para realizar una síntesis mientras que la enzima TTP0042 se sobreexpresa mejor y presenta mayor actividad que la TTP00222. Además, dada la bajísima actividad específica de ésta enzima, resulta difícil reunir suficiente cantidad de proteína purificada para una sola reacción en las condiciones más idealizadas (1,8U/mL de medio). Esto hace que la enzima TTP0222 sea poco atractiva como biocatalizador en la síntesis de glicósidos. Por otro lado, los resultados de este último ensayo permiten concluir que los extractos celulares de T42kat poseen la actividad de sintetizar el producto de autocondensación β [1→3] pese a carecer de la enzima TTP0042 debido a que la principal β -galactosidasa presente en tales extractos (TTP0222) posee ésta conducta sintética.

4.2.3. Reacciones de transglucosidación con biocatalizadores termófilos en presencia de líquidos iónicos.

4.2.3.1. Reacciones de transglucosidación con extractos celulares de HB27 en presencia de líquidos iónicos.

Considerando que el disacárido de mayor relevancia obtenido con los extractos celulares de HB27 inducido es el Gal- β (1 \rightarrow 4)-GlcNAc por ser un precursor en la síntesis del antígeno HII,²⁹⁰ antígenos asociados a los tumores,⁴⁻⁸ y por sus numerosas vinculaciones en glicoproteínas y glicolípidos,¹³⁻¹⁵ se decidió evaluar esta síntesis utilizando líquidos iónicos (30% v/v), la estructura de los líquidos iónicos utilizados aparece más adelante en el esquema 20. Se utilizó una dicha cantidad de líquido iónico, ya que dentro de las referencias disponibles sobre el uso de líquidos iónicos en reacciones catalizadas por β -galactosidas se mencionan cantidades similares para mejorar los rendimientos de disacárido (Gal- β [1 \rightarrow 4]-GlcNAc) y aumentar la estabilidad de la enzima.¹²⁶ Las demás condiciones de síntesis utilizadas, se modificaron respecto a las condiciones anteriores, a fin de favorecer la reacción de síntesis sobre la hidrólisis. Por ello el medio fue cuatro veces más concentrado que en las reacciones estudiadas anteriormente (0,17M de *p*NP- β -Gal y 0,85M GlcNAc), y 36 unidades enzimáticas, en el mismo volumen de tampón o mezcla buffer/líquido iónico (1,00 mL).

Tabla 39. Síntesis de glicósidos (%) utilizando *p*NP- β -Gal como donador y extractos celulares de HB27 (inducido con celobiosa) en fosfato de sodio pH 5,50 25 mM a 80°C. Los porcentajes fueron calculados con base en las áreas obtenidas mediante HPLC-ELSD a las 3 horas de reacción.

Medio de Reacción	Autocondensado Gal β [1 \rightarrow 3]Gal β - <i>p</i> NP	Autocondensado Gal β [1 \rightarrow 6]Gal- β - <i>p</i> NP	Hidrólisis (galactosa)	Gal β [1 \rightarrow 4]GlcNAc	Gal β [1 \rightarrow 6]GlcNAc
Tampón	40	17	--	40	3
[Bmim][PF ₆]	--	11	4	63	22
[Omim][PF ₆]	--	--	56	31	13
[CPMA][MeSO ₄]	--	--	22	64	14
[Troma][Ntf ₂]	7	7	49	36	1

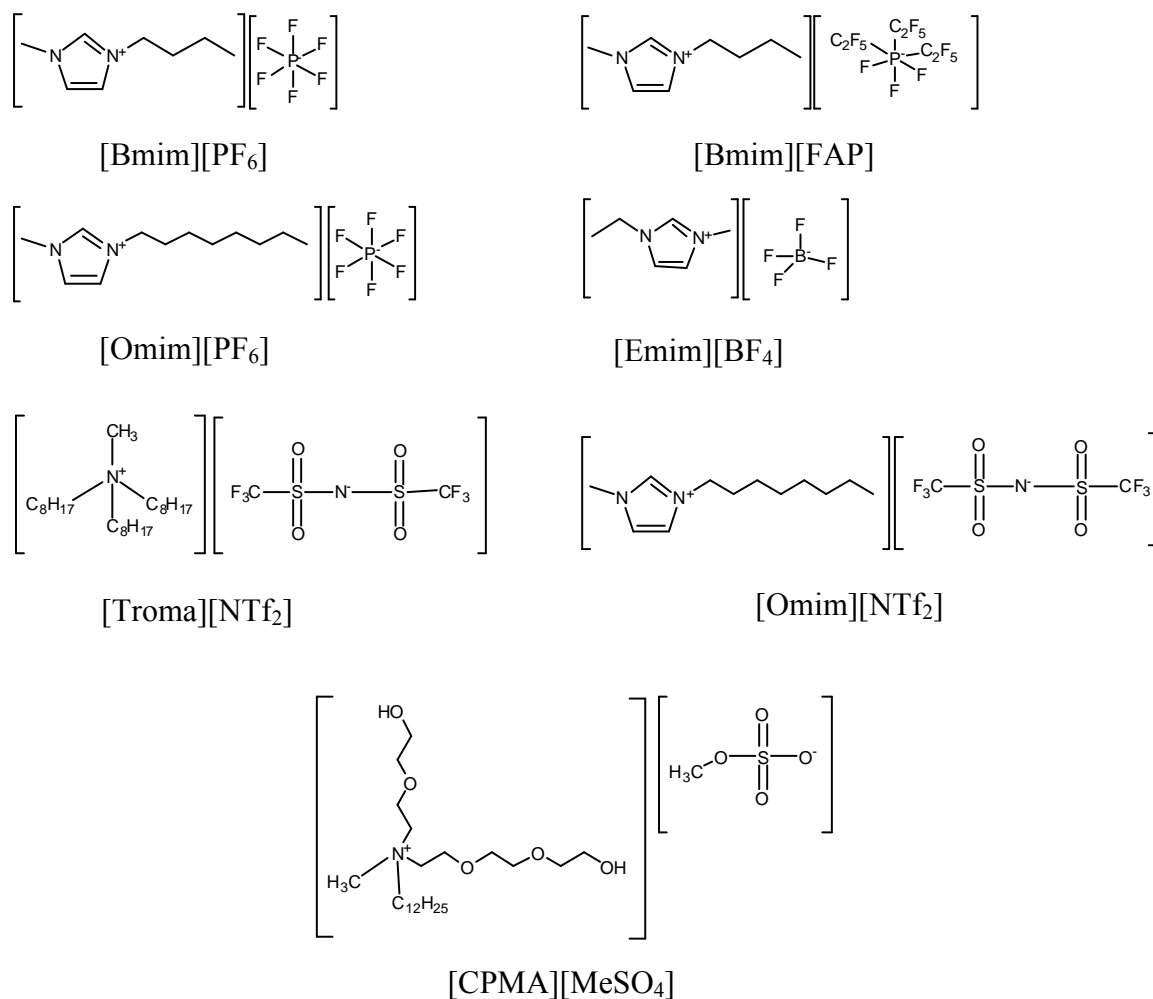
Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 39, donde se evidencia que las condiciones de reacción utilizadas favorecen en general, la síntesis de glicósidos, siendo éstas mejores en líquidos iónicos que en el medio tamponado. Dos de los líquidos evaluados: [Omim][PF₆] y [Troma][Ntf₂] mostraron rendimientos ligeramente inferiores de Gal- β (1 \rightarrow 4)-GlcNAc respecto al medio acuoso tamponado. Los otros dos líquidos

utilizados: [Omim][PF₆] y [CPMA][MeSO₄] presentaron un aumento en la síntesis del disacárido Gal-β(1→4)-GlcNAc respecto al medio acuoso. Finalmente, de la tabla 38 se puede apreciar que algunos líquidos iónicos tienden a favorecer levemente la síntesis de Gal-β(1→6)-GlcNAc.

En el caso de [Bmim][PF₆], [Omim][PF₆] y [Troma][Ntf₂] la catálisis enzimática ocurre en un sistema de dos fases, mientras que la reacción con [CPMA][MeSO₄] ocurre en un medio homogéneo. Esta variedad de entornos químicos y medios de reacción hacen suponer, que las interacciones propias de cada líquido iónico con el medio de reacción y la enzima, son las responsables en las modificaciones de la regioselectividad de la reacción. Por este motivo, es que más adelante se planteará un estudio de interacciones moleculares con la finalidad de explicar este tipo de fenómenos.

4.2.3.2. Síntesis de galactósidos con la enzima TTP0042 his₆tag (expresada en *E. coli*) en líquidos iónicos.

Una vez descartada la posibilidad de que el organismo productor de la enzima (HB27 ó *E. coli*), pudiese afectar los resultados en las reacciones de síntesis de glicoconjugados (puntos 4.2.2.3 y 4.2.2.4), se decidió continuar utilizando la enzima producida en *E. coli*, dada su facilidad de purificación y mejores rendimientos tanto en expresión como en purificación. Conociendo que el aceptor, de mayor potencial en síntesis de disacáridos, es el GlcNAc se decidió modificar las condiciones de reacción con el fin de hacer que la enzima desplace su equilibrio hacia mejores rendimientos. Se evaluaron en total 7 diferentes líquidos iónicos, en su mayoría insolubles en agua a temperatura ambiente e incluso a las temperaturas de reacción (65°C), siendo esto es una gran ventaja por que permite plantear la recuperación del líquido iónico por simples procedimientos como la centrifugación y decantación. Este es el caso de: [Bmim][PF₆], [Omim][PF₆], [Toma][Ntf₂] y [Omim][Ntf₂]. El detalle de las estructuras moleculares de los diferentes líquidos utilizados con la enzima TTP0042 se muestra en el esquema 21, mientras que las características generales de los aparecen en la tabla 40.

**Esquema 21.** Líquidos iónicos utilizados con la β-galactosidasa TTP0042.**Tabla 40.** Propiedades fisicoquímicas de los líquidos iónicos utilizados en el presente estudio.

Compuesto	Masa molar (g.mol ⁻¹)	Densidad (g.mL ⁻¹)	Conductividad (mS ⁻¹)	Log P	Solubilidad en agua (30% m/v)
[Bmim][PF ₆]	284,2	1,24 ²⁹¹	0,146 ²⁹²	-2,39 ²⁹³	insoluble
[Bmim][FAP]	584,2	1,63 ²⁹⁴	2,3 ^a ²⁹⁴	N/D	insoluble
[Emim][BF ₄]	198,0	1,24	1,4 ²⁹⁵	-2,66 ²⁹⁶	soluble
[Omim][PF ₆]	340,3	1,37 ²⁶⁶	N/D	-0,35 ²⁹⁶	insoluble
[Omim][NTf ₂]	475,5	1,25	N/D	0,79 ²⁹⁶	insoluble
[Troma][NTf ₂]	648,9	1,08 ²⁹⁷	0,04 ^{a, c}	N/D ²⁹⁸	insoluble
[CPMA][MeSO ₄]	517,7	1,21	N/D	N/D	soluble

N/D: Dato no determinado. ^a mS/cm² ^b Dato medido con el líquido saturado en agua a 20°C. ^c Tomado de www.sigmaaldrich.com

Las reacciones se llevaron a cabo según la metodología descrita en la sección 3.4.3.2. El porcentaje de LI utilizado inicialmente fue de 30 % ya que dentro de las referencias¹²⁶ disponibles sobre el uso de líquidos iónicos en reacciones catalizadas por β -galactosidas se mencionan cantidades similares a esta, para mejorar los rendimientos de disacárido (Gal- β [1 \rightarrow 4]-GlcNAc) y aumentar la estabilidad de la enzima.

Como puede observarse en la tabla 41, los rendimientos de Gal β [1 \rightarrow 4]GlcNAc obtenidos permiten alcanzar porcentajes de disacáridos superiores a los obtenidos en condiciones más diluidas o en tampón. Así mismo, la tabla demuestra que al utilizar líquidos iónicos como cosolventes fue posible observar distintos comportamientos en el resultado de la reacción. En algunos casos, los líquidos iónicos anulan la síntesis del producto de autocondensación, apareciendo el compuesto de interés β [1 \rightarrow 4] en un alto porcentaje: 71% para [Emim][PF₆], 70% para [Bmim][PF₆], 80% para [Omim][PF₆], 70% para [Troma][Ntf₂] y 67% para [Omim][Ntf₂]. En el caso de [CPMA][MeSO₄] se observa un cambio de regioselectividad, ya que la cantidad de disacárido β [1 \rightarrow 6] es de 46%.

Tabla 41. Síntesis de glicósidos (%) catalizada por TTP0042 his₆tag (*E. coli*) en 30% de LIs en fosfato de sodio pH 6,00 50 mM a 65°C. Los porcentajes fueron calculados con base en las áreas obtenidas mediante HPLC-ELSD tras 3 horas de reacción.

Medio de Reacción	Autocondensado Gal β [1 \rightarrow 3]Gal β -pNP	Autocondensado Gal β [1 \rightarrow 6]Gal- β -pNP	Hidrólisis (galactosa)	Gal β [1 \rightarrow 4]GlcNAc	Gal β [1 \rightarrow 6]GlcNAc
Tampón	38	16	--	46	--
[Emim][PF ₆]	13	3	3	71	10
[Bmim][PF ₆]	--	4	19	70	8
[Omim][PF ₆]	--	6	11	80	4
[Bmim][FAP]	69	13	2	15	1
[CPMA][MeSO ₄]	3	--	33	18	46
[Troma][Ntf ₂]	6	12	10	70	3
[Omim][Ntf ₂]	9	14	8	67	2

La figura 48 muestra un cromatograma típico de reacción en presencia de medio tamponado (figura 48a) y de medio con 30% v/v de L.I. (figura 48b), en ella es posible apreciar que la cantidad de disacárido sintetizado es muy superior cuando se utiliza líquido iónico respecto a la producida por la enzima en medio únicamente tamponado, además es claro observar una disminución general de la reacción de autocondensación,

así como una modificación en tal síntesis, favoreciendo el producto de autocondensación Gal β [1 \rightarrow 6]Gal- β -pNF.

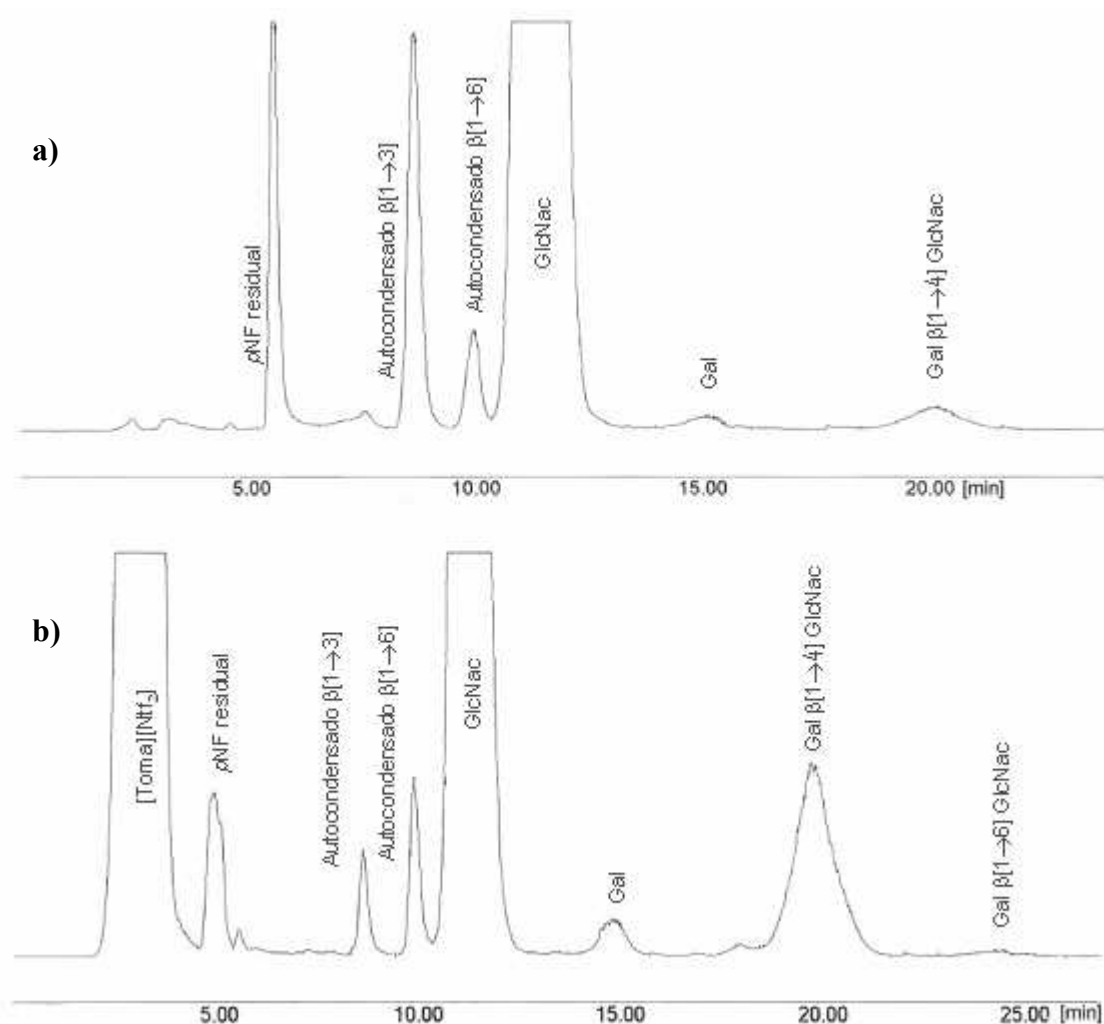


Figura 48. Cromatogramas obtenidos por HPLC-ELSD para la reacción catalizada por la enzima TTP0042 his₆tag (*E. coli*) entre GlcNAc y pNF- β -Gal. Las muestras fueron tomadas luego de 3 horas de reacción y se trataron de la misma forma. a) Reacción en tampón (fosfato de sodio, pH 6,0, 50 mM); b) reacción en medio tamponado con 30% v/v de [Toma][Ntf₂].

Efecto de la concentración de líquidos iónicos sobre la síntesis enzimática de Gal β [1 \rightarrow 4]GlcNAc con TTP0042

Partiendo del hecho que los líquidos iónicos poseen un efecto sobre la actividad catalítica de la enzima TTP0042, se decidió evaluar la influencia que posee la concentración de líquido iónico sobre la síntesis enzimática utilizando pNF- β -Gal como donador y GlcNAc como aceptor. Para este ensayo se usaron los líquidos que presentaron mejores resultados

en síntesis del disacárido Gal β (1 \rightarrow 4)GlcNAc y Gal β (1 \rightarrow 6)GlcNAc. Se realizaron reacciones a distintas concentraciones de líquido iónico: 0%, 5%, 10%, 20% y 30% en las mismas condiciones de donador, aceptor y tampón. Los resultados obtenidos se pueden apreciar en la figura 49.

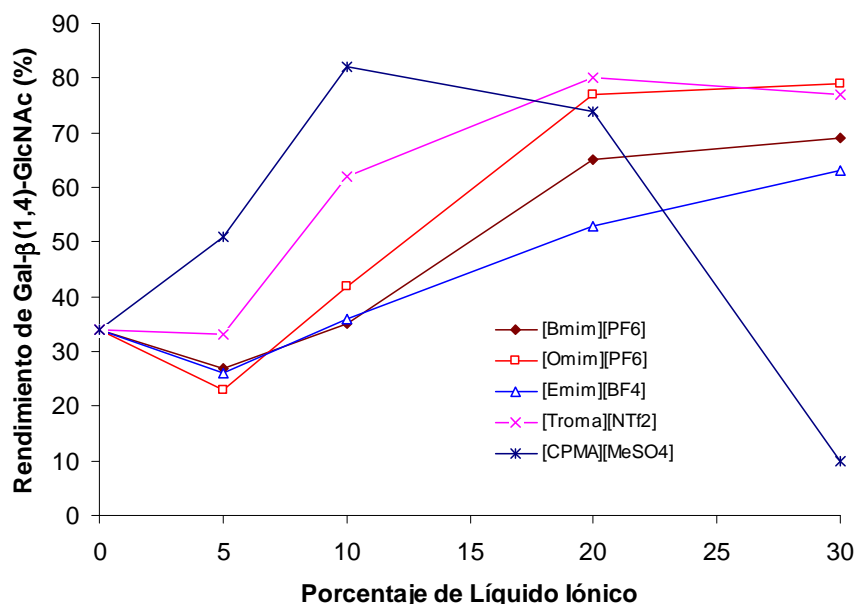


Figura 49. Efecto de la concentración de distintos líquidos iónicos en la actividad sintética de Gal β (1 \rightarrow 4)GlcNAc utilizando la enzima TTP0042.

En el caso de los LIs: [Bmim][PF₆], [Omim][PF₆], [Troma][Ntf₂] y [Emim][PF₆], el % de LI óptimo para la síntesis de Gal β (1 \rightarrow 4)GlcNAc es de un 20% a 30%, este dato es similar a la concentración de líquido empleada por Kaftzik y colaboradores en la síntesis de Gal β (1 \rightarrow 4)GlcNAc utilizando la β -galactosidasa de *B. circulans*, quienes determinaron que la adición de un 25% de líquido iónico (metilsulfato de 1,3-dimetilimidazolio) mejoraba la síntesis del disacárido con rendimientos de hasta un 60%.¹²⁶ En el caso del LI: [CPMA][MeSO₄], observamos que a un 5 % de LI ya existen efectos notorios sobre la regioselectividad de la reacción y que tales efectos se maximizan al aumentar hasta un 10% la mezcla de reacción, que permite alcanzar hasta un 82% de rendimiento en la síntesis de Gal β (1 \rightarrow 4)GlcNAc.

Por otra parte, la figura 49 muestra que a bajas concentraciones LIs (5%) no se observa un efecto significativo en la síntesis enzimática de disacáridos (23%-33%), siendo incluso

menores que los rendimientos del medio acuoso tamponado (34%). De estos resultados podemos concluir que la concentración de líquido iónico afecta de forma significativa a los rendimientos y de la enzima, sin embargo, al tener en cuenta que los líquidos utilizados, son en su mayoría insolubles en agua ([Bmim][PF₆], [Omim][PF₆], [Troma][Ntf₂]), el fenómeno queda en la interface del agua y el líquido iónico. De ser así, la agitación cumple un papel crucial en la síntesis, pues una eficiente agitación conlleva a que el líquido iónico se subdivide en pequeñas partículas, lo que aumenta significativamente el área de contacto entre el LI y el medio acuoso, haciendo más notorio el efecto del LI sobre la enzima. La mayor excepción observada en todas las tendencias encontradas, la ofrece el líquido [CPMA][MeSO₄], el cual primeramente, se diferencia de la mayoría de los líquidos estudiados por dos motivos principales:

- 1) Es soluble en agua (de los otros disolventes solo el [Emim][BF₄] es soluble en agua)
- 2) Por su estructura química no tiende a hidrolizarse formando HF, lo que lo hace más estable en su uso respecto a los demás líquidos iónicos y menos desnaturizante para la enzima.

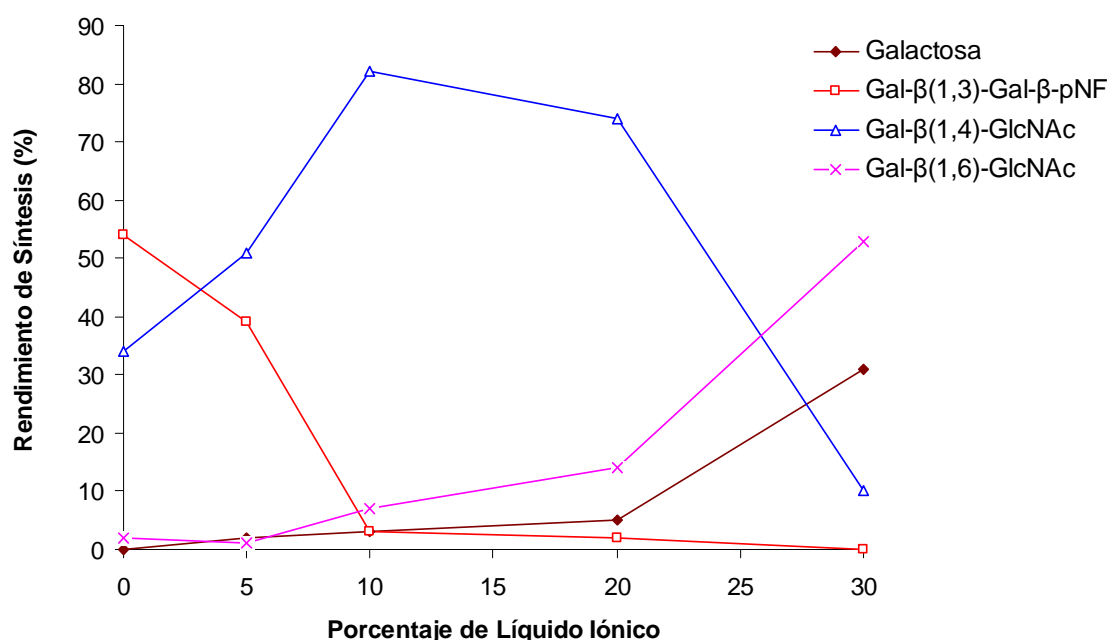


Figura 50. Efecto de la concentración de [CPMA][MeSO₄] en la síntesis de distintos disacáridos utilizando la enzima TTP0042.

En la figura 50 muestran los resultados obtenidos en la reacción de transglicosidación utilizando la enzima TTP42 utilizando *p*NF- β -Gal como donador y GlcNAc como aceptor. a diferentes porcentajes de [CPMA][MeSO₄] en el medio de reacción. Las variaciones en las concentraciones de este líquido pueden favorecer la formación de uno u otro isómero como producto predominante en la reacción. A bajas concentraciones (5%-10%) de [CPMA][MeSO₄] se puede obtener como producto principal Gal β (1 \rightarrow 4)GlcNAc, mientras que al 30% de éste líquido iónico, el producto predominante en la mezcla de reacción es el Gal β (1 \rightarrow 6)GlcNAc.

4.2.4. Síntesis de disacáridos con la enzima TTP0042 *his*₆tag (*E. coli*) en disolventes verdes.

Partiendo de los buenos resultados obtenidos con la enzima TTP0042 en presencia de líquidos iónicos, se decidió repetir la experiencia utilizando una concentración de 2 M de los distintos disolventes verdes disponibles en nuestro laboratorio: derivados cíclicos del glicerol, derivados de dimetil amida y otros disolventes derivados del glicerol (cadena abierta). Dado que no existían datos previos de la enzima TTP0042 en presencia de éstos disolventes (como si ocurría con la enzima Biolacta¹³)

4.2.4.1. Síntesis de disacáridos con TTP0042 en presencia de derivados cíclicos del glicerol

Las características generales de éstos disolventes se presentaron anteriormente en la tabla 20. Dadas sus características se pueden categorizar como disolventes de alta polaridad y muy hidrófilos, lo que en principio augura compatibilidad con enzimas hidrófilas como las glicosidasas. Sus estructuras se caracterizan por ser disolventes de tipo hemiacetal que están en equilibrio con sus respectivas formas abiertas.

Los resultados obtenidos en la síntesis de disacáridos con los derivados cíclicos del glicerol se muestran en la tabla 42. De ellos se puede apreciar que los disolventes G1 y G2 contribuyen de forma importante a la síntesis de disacáridos y disminuyen la síntesis de productos de autocondensación del donador, llegando a obtenerse un 0% de autocondensados con G2 y hasta un 77% de disacárido β (1 \rightarrow 4).

Tabla 42. Síntesis de disacáridos con la enzima TTP0042 en presencia de disolventes verdes derivados del glicerol (estructura cíclica).

Medio de Reacción	Autocondensado Galβ[1→3]Gal β- <i>p</i> NP	Autocondensado Galβ[1→6]Gal-β- <i>p</i> NP	Hidrólisis (galactosa)	Galβ[1→4]GlcNAc	Galβ[1→6]GlcNAc
Tampón	73	10	--	17	--
G1	33	5	7	55	--
G2	--	6	--	77	17
G3	--	--	--	--	--

La enzima se mostró inactiva en presencia de G3. Esto probablemente se debe a que el disolvente G3 está en equilibrio con la cetona y el glicerol, resultando incompatible con la naturaleza de la enzima y por ello desnaturalizándola. Los resultados de HPLC mostraron que la enzima se inactivo desde el inicio de la reacción y no realizó ningún tipo de conversión.

4.2.4.2. Síntesis de disacáridos con TTP0042 en presencia de disolventes derivados de cadena abierta del glicerol

Se utilizaron nueve disolventes derivados del glicerol facilitados por el Profesor José I. García (CSIC, Zaragoza). La estructura de cada uno de los disolventes se mostró en el esquema 18. Las características generales de los mismos aparecen reportadas en la tabla 19. El uso de tales disolventes aportó dos resultados muy distintos entre sí (Tabla 43), por una parte, se obtuvieron rendimientos muy altos de disacárido Galβ(1→4)GlcNAc, destacando principalmente obtenidos con: GC8, GC9 y GC12, cuyos valores son superiores al 90% y resultados importantes con GC4 y GC10 que superan el 70% de síntesis de disacárido.

Por otra parte, se obtuvieron rendimientos muy bajos o nulos con los disolventes: GC6, GC7 y GC11, probablemente debido a una desnaturalización de la enzima, ya que no se consumió el reactivo inicial y las concentraciones de sustratos permanecieron invariables en el tiempo, en el caso del disolvente GC5 la reacción transcurrió de forma parcial, los reactivos se llegaron a consumir hasta un 48% de la reacción, aunque con una regioselectividad desplazada hacia la síntesis de Galβ(1→4)GlcNAc (75%).

Tabla 43. Síntesis de disacáridos con la enzima TTP0042 en presencia de disolventes verdes derivados del glicerol.

Medio de Reacción	Autocondensado Gal β [1 \rightarrow 3]Gal β - <i>p</i> NP	Autocondensado Gal β [1 \rightarrow 6]Gal- β - <i>p</i> NP	Hidrólisis (galactosa)	Gal β [1 \rightarrow 4]GlcNAc	Gal β [1 \rightarrow 6]GlcNAc
GC4	5	1	4	75	15
GC5 ^a	22	--	--	78	--
GC6 ^b	--	--	--	--	--
GC7 ^b	--	--	--	--	--
GC8	--	--	3	91	6
GC9	1	3	1	91	4
GC10	--	--	4	74	22
GC11 ^b	--	--	--	--	--
GC12	1	2	--	94	3

A juzgar por las estructuras de los disolventes que han aportado resultados importantes con esta enzima y aquellos que la han inactivado, es difícil establecer una correlación entre su naturaleza química y los resultados obtenidos durante las reacciones, así por ejemplo los disolventes GC8 y GC9 aportan excelentes resultados de síntesis siendo ambos disolventes fluorados, pero contradictoriamente el disolvente GC7 que es fluorado no permitió la reacción. Similar caso ocurre con el disolvente GC11 que no aporta ningún resultado en la síntesis de disacáridos, pero al estudiar los resultados de sus homólogos GC10 y GC12, cuya mayor diferencia es la metoxilación del hidroxilo 2 del glicerol, se obtienen resultados excelentes o muy buenos.

4.2.4.3. Síntesis de disacáridos con TTP0042 en presencia de derivados de *N,N*-dimetilamida

Se utilizaron tres derivados de la dimetilamida solubles en agua facilitados por la empresa Cognis GmbH, de Alemania. Estas sustancias son disolventes derivados de biomasa por lo que su uso como medio de reacción se considera sostenible.²⁷⁹ La estructura de cada uno de los disolventes derivados de la dimetilamida se mostró en el esquema 18. Las características generales de los mismos se describieron en la tabla 20. Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 44, en ellos se evidencia nuevamente que las condiciones de reacción pueden favorecer la síntesis de disacárido β (1 \rightarrow 4), obteniéndose rendimientos de hasta 80% de Gal β (1 \rightarrow 4)GlcNAc con el disolvente DMA1, sin embargo el disolvente DMA2 no consumió los reactivos totalmente, por lo

que pese a tener un equilibrio desplazado hacia la síntesis de Gal β (1 \rightarrow 4)GlcNAc con un 65% de los productos sintetizados, la conversión final es cercana al 48%. Estos disolventes han sido utilizados anteriormente con la β -galactosidasa de *B. circulans*²⁷³ y de *E. coli*²⁹⁹ obteniéndose con ellas, variaciones en la regioselectividad de las enzimas y mejoras en la síntesis de disacáridos, que han sido explicadas en términos de polaridad, hidrofobicidad e interacciones moleculares con los disolventes.

Tabla 44. Síntesis de disacáridos con la enzima TTP0042 en presencia de disolventes biomásicos derivados de la dimetilamida.

Medio de Reacción	Autocondensado Gal β [1 \rightarrow 3]Gal β -pNP	Autocondensado Gal β [1 \rightarrow 6]Gal- β -pNP	Hidrólisis (galactosa)	Gal β [1 \rightarrow 4]GlcNAc	Gal β [1 \rightarrow 6]GlcNAc
Tampón	73	10	--	17	--
DMA1	7	2	3	80	8
DMA2	35	--	--	65	--
DMA3	--	--	4	68	28

4.2.4.4. Efecto de la concentración de disolventes verdes sobre la regioselectividad de la enzima TTP0042

Dado que en el caso de los líquidos iónicos punto 4.2.3.2, se logró establecer una dependencia de la regioselectividad de la enzima en función de los líquidos utilizados, se decidió repetir la experiencia utilizando distintas concentraciones de disolventes verdes. Para ello se seleccionaron disolventes de cada uno de los tres grupos utilizados: 1-derivados cíclicos del glicerol, 2-derivados de cadena abierta del glicerol y 3-derivados de la *N,N*-dimetil amida. Se eligieron los disolventes: G2, GC4, GC9, GC12 y DMA1, ya que sus rendimientos en la síntesis de Gal β (1 \rightarrow 4)GlcNAc son superiores al 70%.

La reacción de transglicosilación se repitió siguiendo los procedimientos descritos en el apartado 3.4.4, las concentraciones de disolvente utilizadas fueron: 0,25M, 0,50M, 1,0M, 1,50M y 2,00M. Como resultado (figura 51), se encontró que los disolventes: G2, GC4, GC9, GC12 y DMA1, presentan una relación casi lineal entre la concentración de disolvente verde utilizado y la síntesis de Gal β (1 \rightarrow 4)GlcNAc. Mientras que el disolvente GC12 modifica la actividad de la enzima produciendo entorno al 75% de

Gal β (1 \rightarrow 4)GlcNAc cuando se utilizan concentraciones entre 0,25M y 1,50M. Este valor aumenta de forma notoria cuando la concentración de GC12 sube a 2,00 M produciendo rendimientos de más del 90% del disacárido en mención.

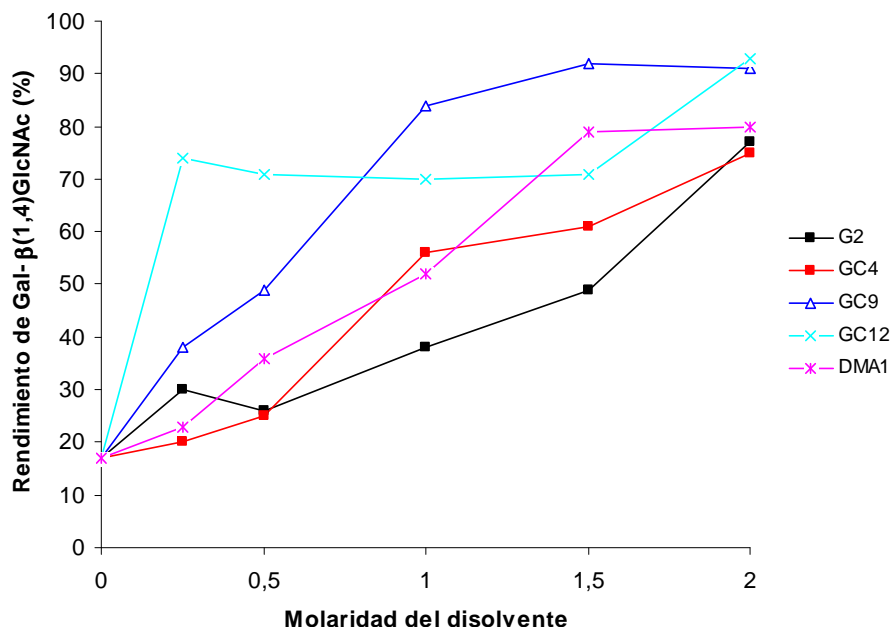


Figura 51. Síntesis de Gal β (1 \rightarrow 4)GlcNAc catalizada por la enzima TTP0042 a distintas concentraciones de disolventes verdes.

4.2.5. Estudio de interacciones moleculares con la enzima TTP0042

Los resultados obtenidos en la síntesis de Gal β (1 \rightarrow 4)GlcNAc catalizada por la enzima TTP0042 utilizando líquidos iónicos como cosolventes demostraron que existe una relación entre la cantidad de líquido iónico utilizado y el porcentaje de Gal β (1 \rightarrow 4)GlcNAc obtenido, ya que en la mayoría de los casos al aumentar las concentraciones de LIs se obtienen mayores rendimientos de dicho disacárido. Sin embargo la relación entre la enzima y los líquidos iónicos permanece sin ser establecida directamente. Por ello, se decidió realizar un estudio de interacciones moleculares entre la enzima TTP0042 y distintos líquidos iónicos, para tratar de establecer el efecto que causa la presencia de tales disolventes sobre la enzima y por ende explicar los importantes resultados obtenidos en la síntesis enzimática de disacáridos en los medios de reacción que contienen LIs. Para

este estudio se utilizaron las técnicas de: SPR, CD y fluorescencia, y finalmente el estudio se acompañó de un modelado molecular y docking.

4.2.5.1. Interacciones moleculares por SPR

El uso de SPR se basa en el estudio de interacciones moleculares mediante la inmovilización de la enzima en una superficie de un chip sobre el cual se fluyen distintos ligandos con los cuales interacciona. En este caso, se utilizó un Chip CM5 funcionalizado con dextrano que posee grupos carboxilos libres sobre los cuales se inmovilizaron 6749 RU de la enzima, luego de activarlo con EDC y NHS en las condiciones descritas en el punto 3.4.5.1. El chip se bloqueó finalmente con etanolamina para eliminar posibles grupos carboxilos activados, los cuales no han inmovilizado la enzima.

Se prepararon disoluciones saturadas de dos líquidos iónicos que ofrecieron importantes resultados con la enzima TTP0042 utilizando el mismo tampón de reacción (fosfato de sodio 50 mM pH 6.0), los líquidos utilizados fueron: [Bmim][PF₆] y [Omim][PF₆]. Las concentraciones máximas que se pudieron alcanzar tras una apropiada agitación fueron: 33,5 mM de [Bmim][PF₆] y 5,94 mM de [Omim][PF₆]. Utilizando estas concentraciones como valores máximos, se logró fluir sobre la enzima inmovilizada en el chip, distintas concentraciones de cada uno de éstos líquidos iónicos, permitiendo obtener mediciones de las interacciones entre la enzima y el líquido iónico. Los resultados de estas interacciones se muestran en la figura 52.

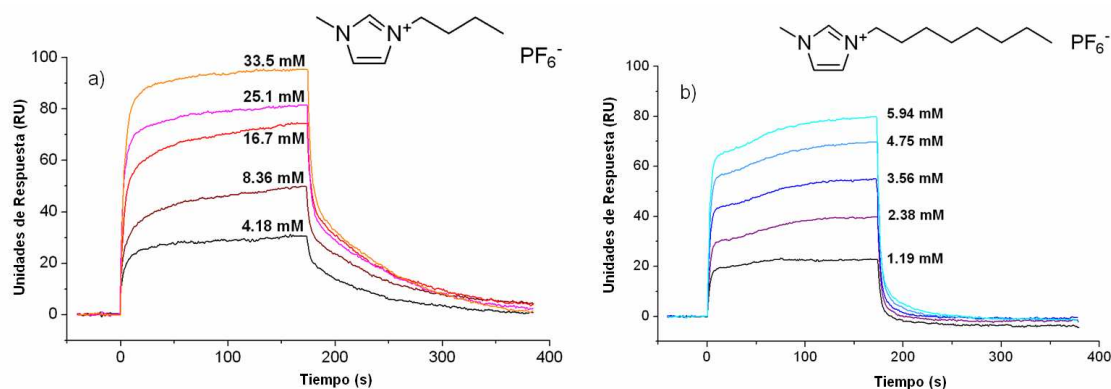


Figura 52. Sensogramas de interacción entre la enzima TTP0042 inmovilizada covalentemente sobre un chip CM5 y los líquidos iónicos: a) [Bmim][PF₆]; b) [Omim][PF₆]

La figura 52 muestra que ambos líquidos iónicos se unen a la enzima de forma reversible y con cinéticas muy rápidas. La enzima muestra una afinidad débil con ambos líquidos por ello primero se intentó determinar los parámetros cinéticos por análisis globales simultáneos en las fase de asociación y disociación para una serie completa de concentraciones utilizando un modelo 1:1, sin embargo, para los modelos propuestos se obtuvieron constantes de velocidad poco fiables debido a que la interacción encontrada resultó ser demasiado débil e inespecífica (en el rango milimolar).

Debido a estas dificultades en la determinación de la constantes de interacción para éstas cinéticas, se utilizó la dependencia de la concentración en los valores de estados estacionarios para determinar valores aparentes de constantes cinéticas (K_D). Como resultado, el valor obtenido de K_D para [Bmim][PF₆] y [Omim][PF₆] fue de 16.5 mM y 8.73 mM respectivamente (Figura 53).

El estudio de interacción por SPR descrito, muestra que ambos líquidos se unen a la enzima a través de interacciones no específicas caracterizadas por cinéticas rápidas y una afinidad dentro del rango milimolar. Estos datos sugieren que [Bmim][PF₆] y [Omim][PF₆] podrían inducir cambios conformacionales en la enzima que puedan dar como resultado un incremento en la actividad enzimática y los cambios en la regioselectividad anteriormente descritos (punto 4.2.3.2).

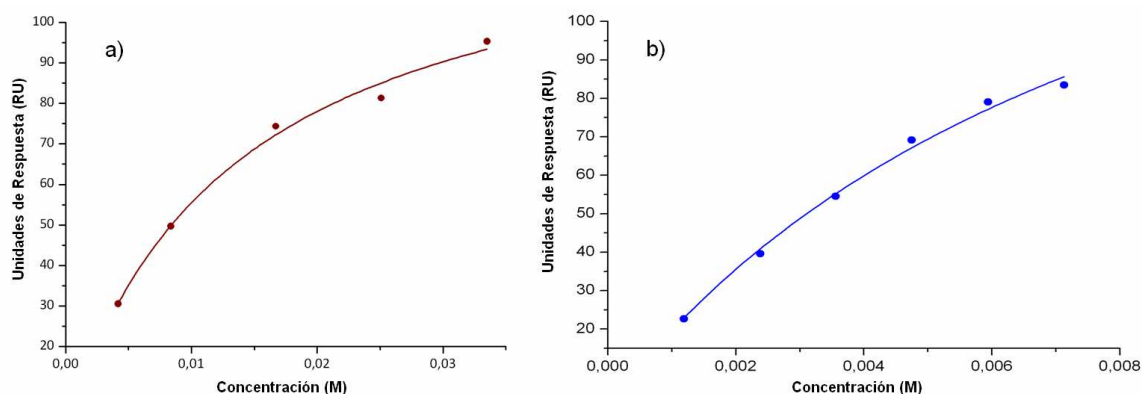


Figura 53. Estudio de afinidad enzima-líquido iónico en el estado estacionario.

4.2.5.2. Estudio de cambios conformacionales por dicroísmo circular

El estudio de interacciones por SPR sugiere una interacción inespecífica que podría estar relacionada a un cambio conformacional de la enzima. Por este motivo se decidió realizar un estudio de DC para determinar los cambios conformacionales en la enzima. Para ello se realizó un espectro de DC de la enzima en condiciones nativas con tampón fosfato de sodio pH 6.0, 10 mM. La misma muestra se analizó a distintas concentraciones del líquido [CPMA][MeSO₄], ya que este líquido posee una mayor solubilidad en agua que los otros líquidos utilizados, no presenta centros quirales capaces de absorber en el dicroísmo circular y además posee la ventaja de que no se hidroliza como ocurre con los LIs fluorados.

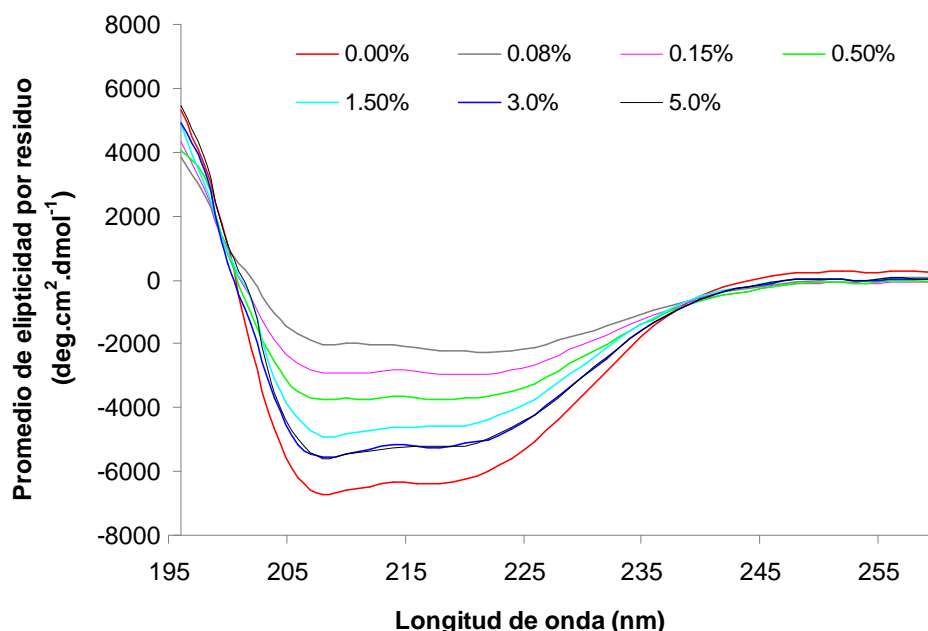


Figura 54. Espectro de dicroísmo circular obtenido para la enzima TTP0042 en tampón fosfato de sodio 10 mM, pH 6.0 y en presencia de distintas concentraciones de [CPMA][MeSO₄].

Se añadieron pequeñas cantidades de [CPMA][MeSO₄] (20% m/v) disuelto en agua destilada a una cubeta de cuarzo con la disolución de enzima (1 mg/mL), las concentraciones finales de líquido iónico fueron: 0,00%, 0,08%, 0,15%, 0,50%, 1,50%, 3,00% y 5,00%. El espectro de DC obtenido para cada una de estas adiciones se muestra en la figura 54. En ella es posible apreciar que la enzima posee una estructura secundaria donde predominan los plegamientos de tipo α -helice, los cuales se reducen notoriamente a bajas cantidades de LI (entre 0,08% y 1,5% m/v), sin embargo, las adiciones posteriores

de LI restablecen parcialmente la estructura de la enzima, hasta llegar a lo que parece ser una saturación del efecto del LI sobre la enzima, de tal forma que a un 3% y a un 5% m/v de [CPMA][MeSO₄], la enzima parece presentar el mismo efecto sobre la elipticidad molar relativa medida en el experimento de CD.

El espectro de dicroísmo circular permitió obtener dos valles de absorción máximos de la enzima a las longitudes de 208 nm y 218 nm. Estos valles se conservaron en todas las concentraciones estudiadas, lo que indica que la enzima conserva estructura de tipo α -helice sin favorecer otros tipos de plegamientos como por ejemplo β -láminas, pero con la variante de que las absorbancias son menores en presencia de [CPMA][MeSO₄], (figura 55), indicando que la enzima sufre un cambio conformacional en la estructura secundaria de la misma, perdiendo estructuras del tipo α -helice.

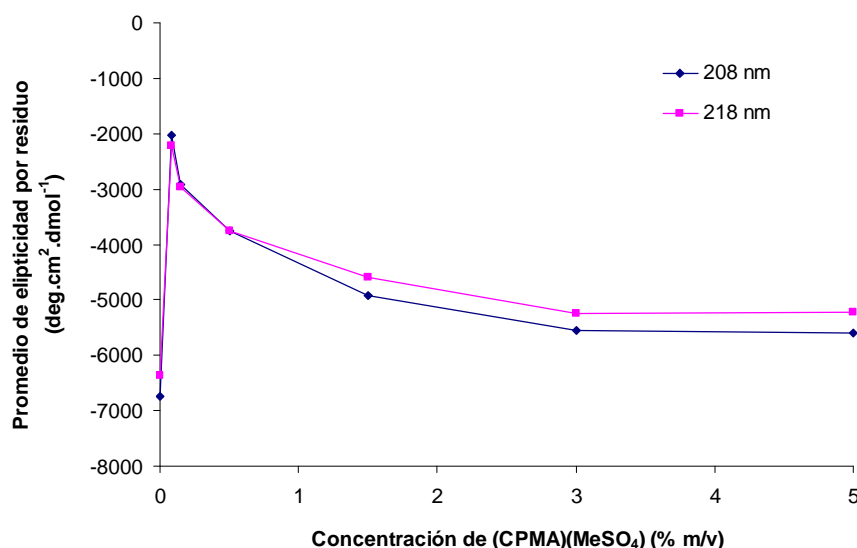


Figura 55. Efecto de la concentración de [CPMA][MeSO₄] sobre los valles de máxima absorción de TTP0042 en DC.

4.2.5.3. Estudio de cambios conformacionales por fluorescencia

Los resultados obtenidos por dicroísmo circular confirman una modificación de la estructura secundaria de la enzima debido a la presencia de LI. Sin embargo, tales cambios no aseguran modificaciones en la estructura terciaria. Por este motivo, se realizó un estudio de emisión de fluorescencia utilizando 295 nm como longitud de excitación de la enzima, buscando favorecer con ello la excitación de los residuos de triptófano (el total de triptófanos en esta enzima es de 13), con la enzima en condiciones nativas y en presencia del mismo líquido iónico.

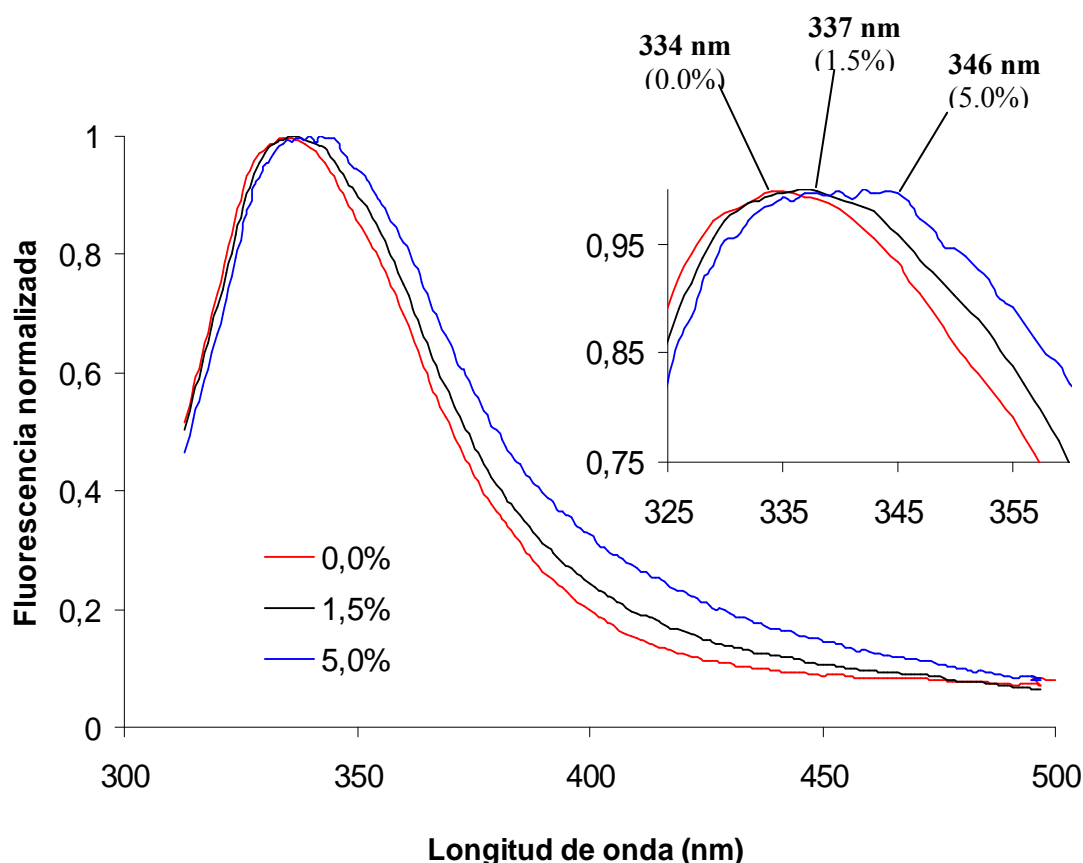


Figura 56. Espectro de emisión de fluorescencia de TTP0042 en tampón fosfato de sodio 10 mM pH 6,0 y a diferentes concentraciones de [CPMA][MeSO₄]. El máximo de emisión de fluorescencia pasa de 334 nm para la enzima en tampón hasta 346 nm para la enzima en 5% de LI.

La figura 56 muestra los resultados obtenidos en el espectro de fluorescencia de TTP0042. El máximo de emisión fluorescente de la enzima en condiciones nativas es de 334 nm, las pequeñas adiciones de líquido iónico (0,08% - 0,50% m/v) no favorecen la modificación del espectro de emisión de fluorescencia de la enzima, por lo que se asume que los entornos químicos de los triptófanos de la enzima sufren pocas o nulas modificaciones, y por ello la estructura terciaria de la enzima no se ve afectada. Luego de una concentración de 1,5% m/v de [CPMA][MeSO₄], se obtiene un desplazamiento de la longitud de onda hasta 337 nm para el valor de máxima emisión de fluorescencia de la enzima, mostrando con ello, cambios en la estructura terciaria de la enzima vinculados a los residuos de triptofanos principalmente. Finalmente, a una concentración de 5% de LI, la enzima continúa mostrando un desplazamiento hacia el rojo, cambiando el valor máximo de emisión fluorescente hasta 346 nm, lo que confirma las modificaciones en la estructura

terciaria de la enzima debido a la presencia de LI, tal y como lo predijeron los estudios de SPR.

Las modificaciones estructurales de la enzima debido a la presencia de [CPMA][MeSO₄], muestran que existen cambios tanto en la estructura secundaria (confirmadas por DC) y en la estructura terciaria. Los cambios en esta última conformación, muestran que la enzima modifica su estructura en zonas poco expuestas, ya que los triptófanos están asociados a las zonas menos periféricas pues son altamente hidrofóbicos y por ello sus residuos se orientan en oposición a los entornos acuosos. Sin embargo, la presencia de LI parece facilitar cambios en la orientación del triptófano probablemente debido a las cadenas alquílicas presentes en el mismo, demostrando con ello que incluso las zonas del interior de la enzima se pueden ver modificadas por adiciones de LI.

4.2.5.4. Efecto de los LIs sobre la estabilidad de la enzima

Los estudios realizados con LI's muestran que la enzima experimenta interacciones débiles e inespecíficas que modifican su estructura terciaria y secundaria, causando, probablemente, los cambios en la regioselectividad y actividad catalítica de la misma. Sin embargo, tales cambios podrían ser apreciados por estudio del comportamiento catalítico de la enzima en presencia y ausencia de LIs.

Por lo anterior, se decidió evaluar la estabilidad térmica de la proteína (0,05 mg/mL) a 80°C en tampón fosfato de sodio 50 mM pH 6.0 y en distintas concentraciones de líquido iónico: a) 0,95% m/v (33,5 mM) para simular la concentración máxima de líquido iónico disuelto en la fase acuosa tal y como se realizó en el estudio de SPR y b) 30% m/v para simular la concentración de LI utilizado en las reacciones de transglicosilación con TTP0042. El líquido iónico seleccionado fue [Bmim][PF₆], ya que ofrece importantes rendimientos en la reacción de síntesis de Gal β (1 \rightarrow 4)GlcNAc.

Los resultados observados (figura 57) mostraron que la enzima se desnaturaliza con rapidez, probablemente debido a la hidrólisis del LI por la presencia de agua, generando ácido fluorhídrico en el medio de reacción, además la temperatura utilizada (80°C) pudo facilitar dicha hidrólisis. La inactivación de la enzima resultó proporcional a la

concentración de LI utilizado, mostrando una inactivación más lenta cuando se emularon las concentraciones de [Bmim][PF₆] utilizadas en el estudio de SPR (0,95% m/v) que al emular las condiciones de transglicosilación (30% m/v) donde la desnaturalización de la enzima fue mucho más rápida (solo 2 h).

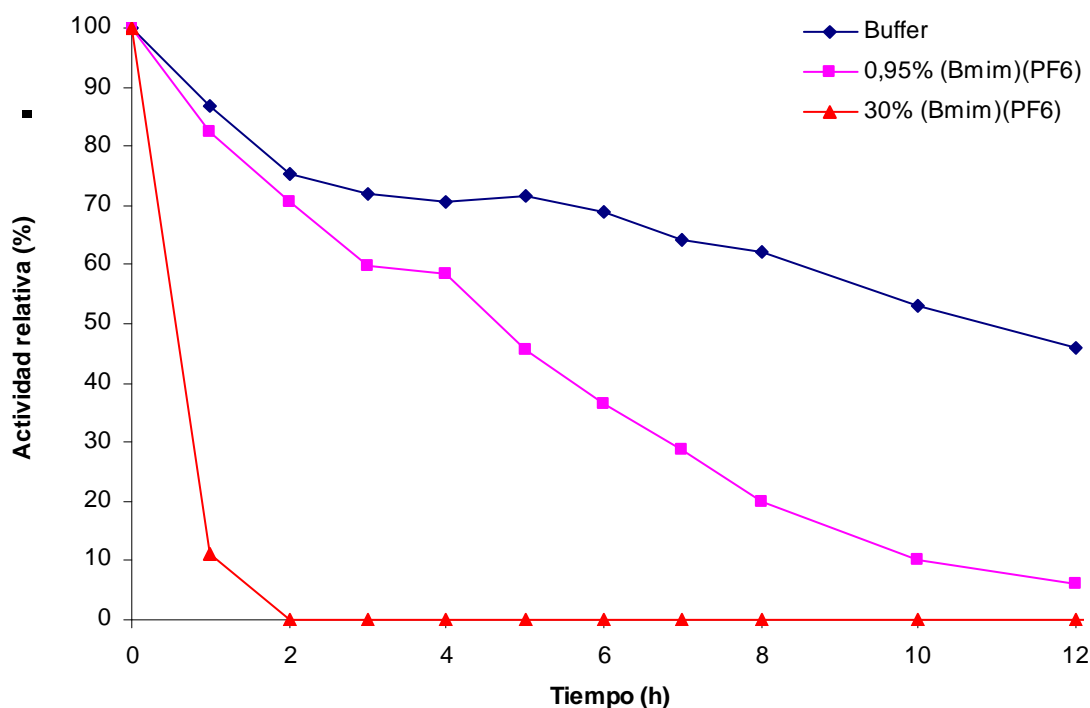


Figura 57. Estabilidad térmica de TTP0042 a 80°C en presencia de [Bmim][PF₆] en concentración equivalente al estudio de SPR (0,95% m/v) y equivalente al medio de reacción (30% m/v).

Tomando en cuenta que la enzima se desnaturaliza por la presencia de líquido iónico, se decidió repetir el mismo experimento, utilizando el líquido [Bmim][FAP]. Los resultados (figura 58) mostraron que la enzima es inestable en la presencia de esta sustancia y con ello explicando las bajas conversiones obtenidas en las reacciones de transglicosilación al utilizar este líquido iónico.

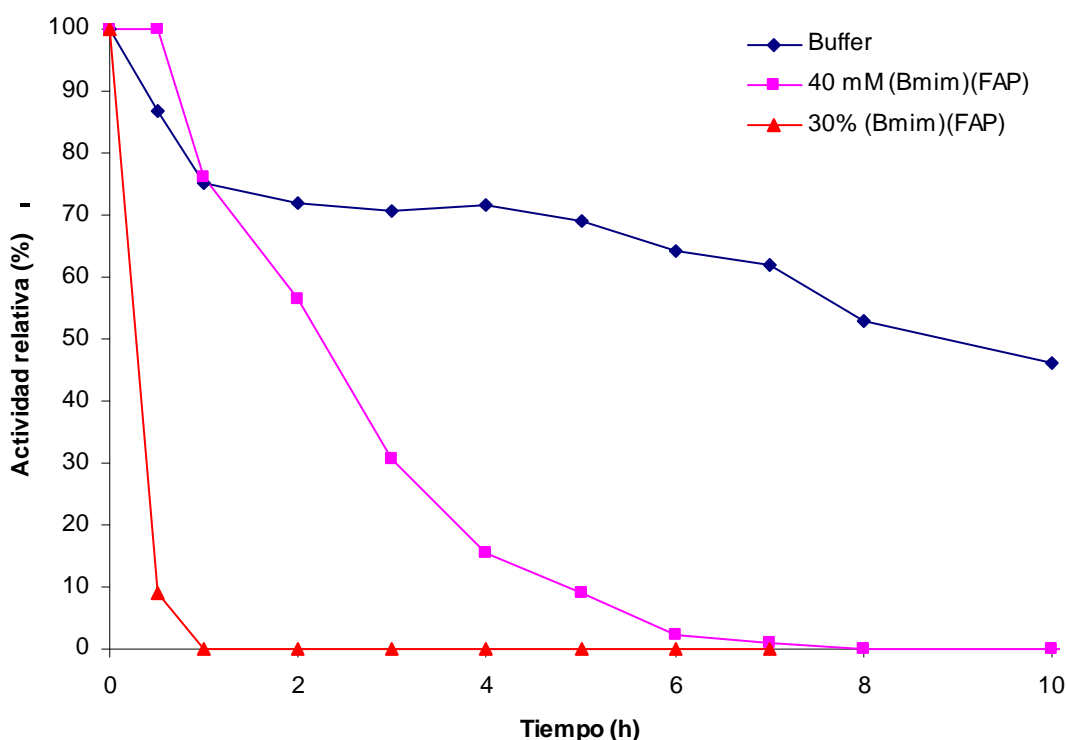


Figura 58. Estabilidad térmica de TTP0042 a 80°C en presencia de [Bmim][FAP] en concentración equivalente al estudio de SPR (0,95% m/v) y equivalente al medio de reacción (30% m/v).

Finalmente, tomando en cuenta que el estudio de DC se realizó con el líquido iónico [CPMA][MeSO₄], en el cual, la enzima posee un máximo de actividad sintética al 10% m/v, se decidió repetir la estabilidad térmica utilizando las mismas condiciones de reacción: 0,05 mg/mL de TTP0042 disuelta en tampón fosfato 50 mM pH 6,00 y 10% de LI a 65°C. Los resultados obtenidos (figura 59) mostraron que la enzima posee actividad durante 180 horas, tanto en tampón como en presencia de [CPMA][MeSO₄], confirmando que la enzima no se desnaturaliza en presencia de ésta sustancia, sus actividades muestran pocas o nulas diferencias durante las primeras 42 horas, aunque su desactivación es ligeramente más rápida en presencia de este LI que en tampón. La vida media de la enzima disuelta en tampón a 65°C es de 96 horas mientras que la vida media de la enzima disuelta en 10% de este LI es de 84 horas.

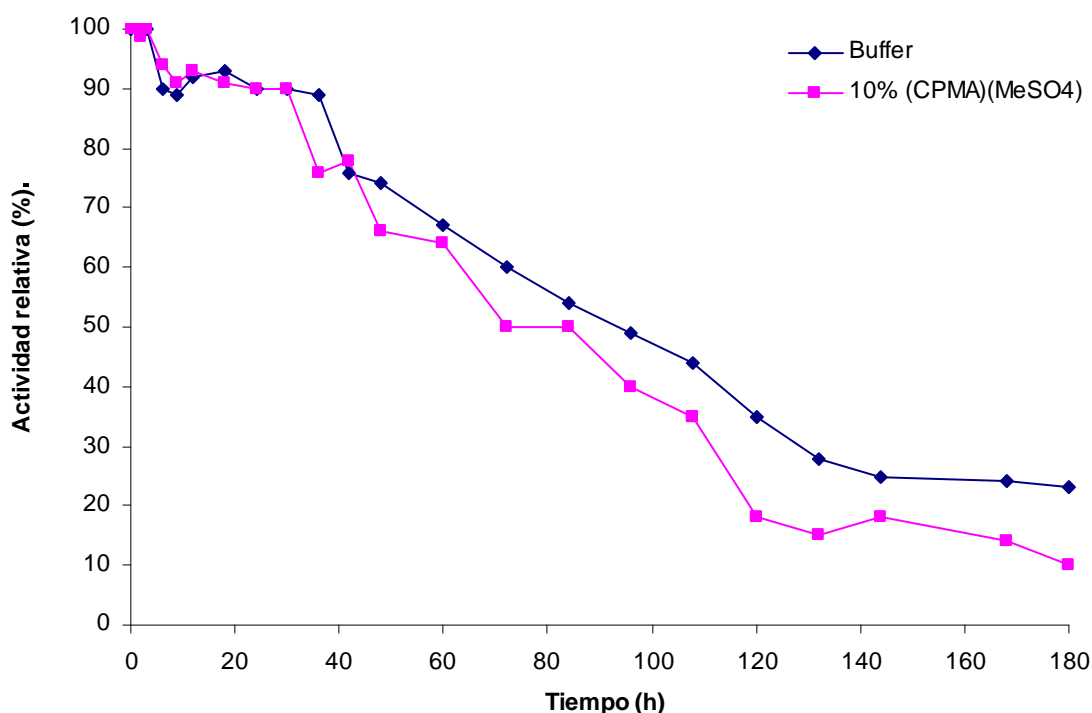


Figura 59. Estabilidad térmica de TTP0042 (0,05 mg/mL) a 65°C en presencia de [CPMA] [MeSO₄] en concentración equivalente al medio óptimo de reacción (10% m/v).

Dada la estabilidad térmica obtenida en [CPMA][MeSO₄], se puede inferir que la enzima es más compatible con este líquido que con los otros utilizados, en parte por que el [CPMA][MeSO₄] no tiende a hidrolizarse como puede ocurrir con los LIs fluorados. Por otra parte, el estudio de estabilidad térmica en este líquido muestra que la enzima no pierde actividad pese a los cambios encontrados en sus estructura secundaria y terciaria, sino que conserva su actividad catalítica, lo que confirma que las interacciones encontradas en el SPR, DC y fluorescencia, no desnaturalizan a la enzima y pueden ser las responsables de los cambios en la regioselectividad de la reacción estudiada.

4.2.5.5. Estudios de modelado molecular y docking

Con el objetivo de poder explicar los cambios conformacionales determinados en la enzima cuando está en presencia de líquidos iónicos se decidió utilizar nuevamente el modelado molecular y el docking. En este caso se seleccionaron los dos líquidos estudiados mediante SPR: [Bmim][PF₆] y [Omim][PF₆]. Se llevaron a cabo dos tipos de simulaciones: I) simulaciones en plazos muy cortos, en el rango de pico segundo con paso muy lento del tiempo para analizar cinéticas, termodinámicas y los puentes de

hidrógeno entre disolventes y enzimas. II) Simulaciones a plazos más largos, en la escala de nano segundos, utilizadas para comprobar posibles cambios conformacionales en el sistema, inducidos por una interacción entre la enzima y el líquido iónico.

Para ambos casos, las dinámicas moleculares se basaron en la similitud estructural del modelo de la β -glucosidasa de *T. thermophilus* HB8 (PDB código 1UG6). Esta enzima solo difiere de TTP0042 en un único residuo, donde la tirosina 320 de la enzima de HB8 se ha sustituido por una histidina (Y320H), por lo que la identidad de los modelos utilizados es de alta confianza. Esta mutación fue incluida en un modelo estructural que fue analizado mediante experimentos de dinámicas moleculares. Con la idea de determinar los posibles cambios estructurales envueltos en las interacciones observadas por los experimentos de SPR, la enzima fue simulada en las condiciones de reacción (30% v/v) con tres sistemas: I) agua, II) [Bmim][PF₆] - agua y III) [Omim][PF₆] - agua. Los valores de RMSD de los carbonos alfa obtenidos a lo largo de la simulación para los tres sistemas confirmaron la estabilidad de los mismos en los medios acuosos y acuosos-LI ensayados. (Figura 60)

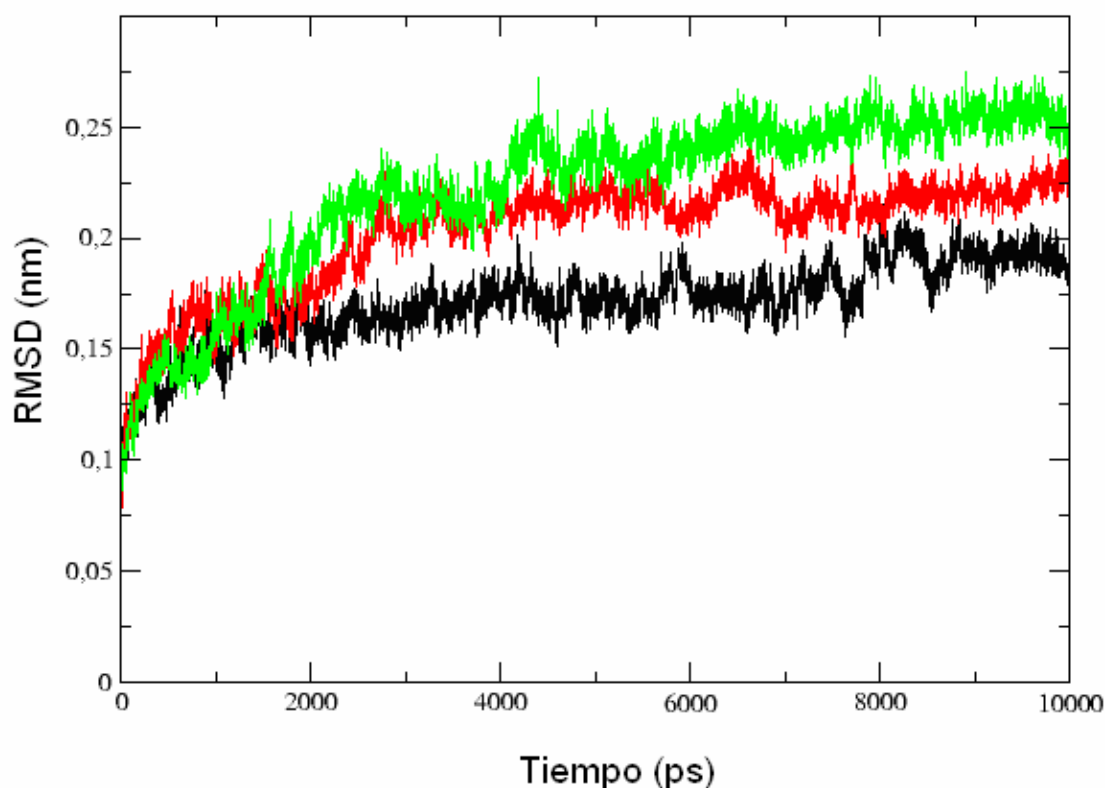


Figura 60. RMSD para simulaciones de los carbonos alfa de ligandos libres: a) agua en color negro b) [Bmim][PF₆] - agua en color rojo c) [Omim][PF₆] - agua en color verde.

Se encontró una pequeña diferencia entre los sistemas de líquidos iónicos y agua. Para poder explicar la selectividad de los ligandos hacia los diferentes sustratos hacia los cuales la enzima muestra afinidad, se simularon los complejos glicosil-enzima por docking automático de una molécula de *p*NF- β -Gal en el centro activo de la enzima, utilizando la mejor ubicación posible de la molécula de galactosa y la posterior formación del enlace covalente entre el residuo Gluc-164. Esta estructura fue de nuevo sometida a docking usando GlcNAc.

Finalmente los complejos fueron solvatados: con los tres sistemas de disolventes antes mencionados para el complejo de GlcNAc y solo con agua para el complejo *p*NF- β -Gal. Para tratar de identificar movimientos de larga amplitud que pudiesen dilucidar el comportamiento experimental de la enzima en las reacciones de transglicosilación, las trayectorias generadas fueron analizadas por mediciones del parámetro RMSD del ligando y por análisis de componente principal. Los resultados de éste análisis (figura 61) permitieron reproducir la selectividad experimental de la enzima.

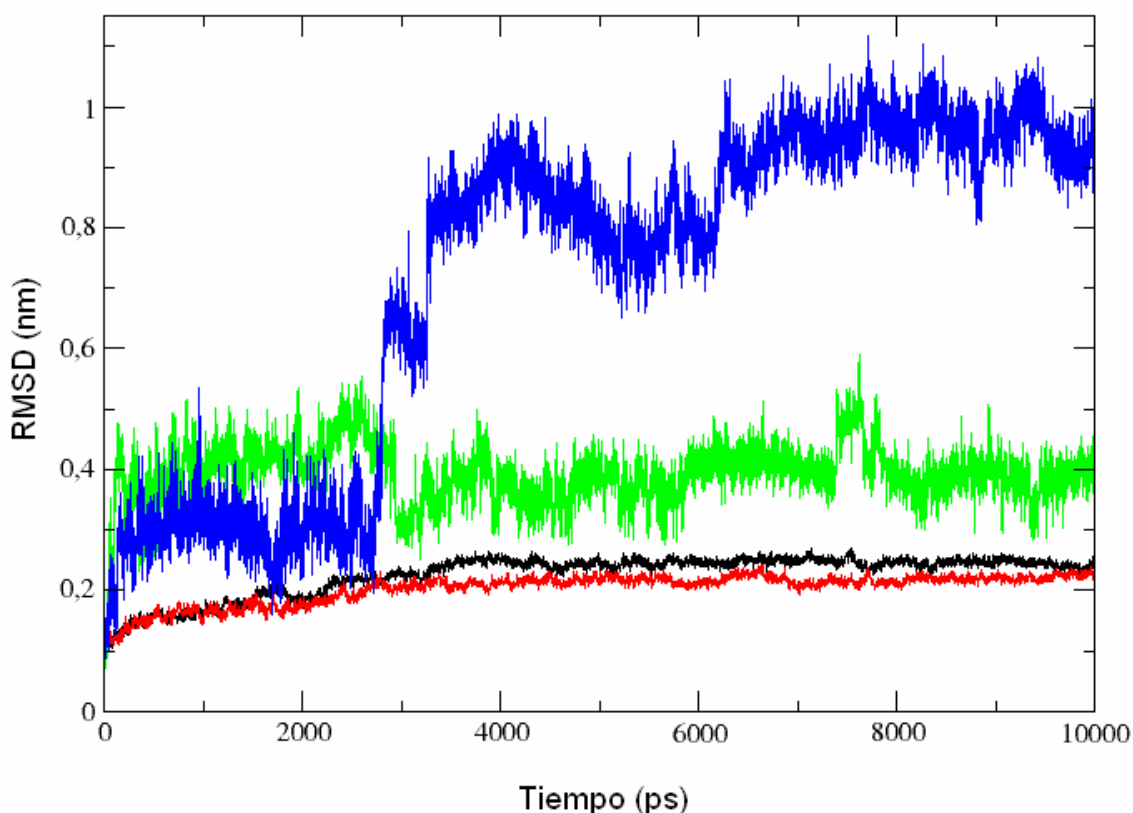


Figura 61. Comparación de los valores de RMSD: a) *p*NF- β -Gal en verde; b) GlcNAc en azul; c) RMSD del carbono alfa en presencia de [Bmim][PF₆] en color negro; d) RMSD del carbono alfa en presencia de [Omim][PF₆] en color rojo.

Como se puede apreciar en la figura 58, el RMSD de GlcNAc en agua genera movimientos de más de 10 Å, antes de re-estabilizar, lo que resulta en el movimiento del ligando desde el centro activo al disolvente después de 2,7 ns. En contraposición, el *p*NF- β -Gal permanece estable en el centro activo durante todo el periodo de la simulación. Una posible explicación de estas diferencias entre diferentes ligandos surge de los resultados obtenidos por análisis del componente principal: el movimiento de mayor amplitud corresponde a un único desplazamiento del bucle entre los residuos Arg-285 y Pro-299 sobre el centro activo de la proteína cuando el GlcNAc es utilizado en el sistema de agua. Este tipo de movimiento de amplio rango no fue observado bajo las otras condiciones simuladas, de hecho, se encontró un pequeño desplazamiento en esta misma región pero en dirección opuesta en el sistema de ligandos libres cuando los LIs estaban presentes, lo que apoya la apertura del centro activo bajo tales condiciones. Las simulaciones también sugieren que la apertura del centro activo podrían ser desencadenadas por ciertos ligandos en condiciones normales, como es el caso del GlcNAc, para el cual, el incremento del RMSD del ligando se correlaciona con el desplazamiento de esta región de la proteína. Este mecanismo podría estar basado en la habilidad de ciertos ligando para llenar el espacio de entrada al centro activo (Figura 62)

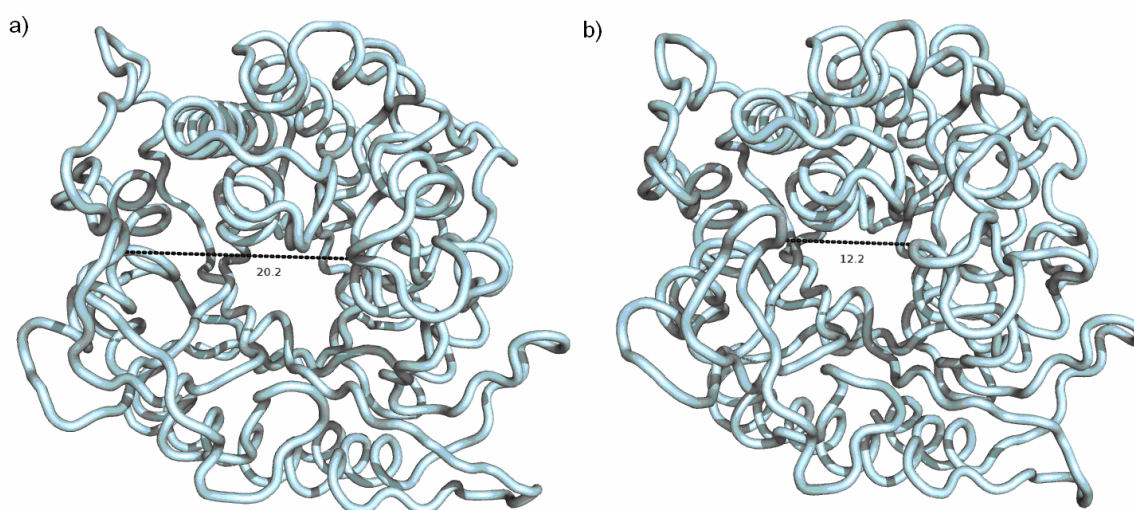


Figura 62. Desplazamientos de los residuos del centro activo entre Arg-285 y Pro-299 para la simulación con GlcNAc en agua.

Por ejemplo, en el caso de *p*NF- β -Gal el grupo de *p*NF interactúa en la zona cercana al sitio de acceso al centro activo, previniendo en cierta forma el desplazamiento de los

residuos dentro de la cavidad y el desplazamiento máximo del ligando en el centro activo. Por otro lado, las mezclas de LI-agua podrían modificar este comportamiento al estabilizar la molécula de GlcNAc en el centro activo, permitiendo que ocurra la reacción. Tal y como otros autores³⁰⁰ han señalado, los LIs pueden atrapar cinéticamente proteínas lo cual podría ser la causa del cambio de flexibilidad del bucle próximo al centro activo, explicando así las diferentes conductas observadas en estos disolventes.

Para caracterizar la interacción entre los disolventes y la proteína, se analizaron las propiedades cinéticas y termodinámicas de los puentes de hidrógeno entre ellos. Los puentes de hidrógeno fueron definidos basándose en un criterio geométrico de la distancia del donador y aceptor de 3.5 Å, sus propiedades fueron calculadas según el método descrito por van der Spoel y colaboradores³⁰⁰ utilizando una versión modificada de la herramienta g_hbond del paquete informático GROMACS para tener en cuenta el carácter aceptor de los átomos de flúor en el disolvente.

Tabla 45. Tiempos de vida de los puentes de hidrógeno y sus energías de activación.

Sistema	Tiempo de vida (ps)	ΔG (kJ/mol)	K_D (Mm)
Agua	7.462	9.510	-
[Bmim][PF ₆]	12.653	10.819	12.66
[Omim][PF ₆]	9.977	10.230	12.06

En esta técnica de análisis, las rupturas de los puentes de hidrógeno son interpretadas por el proceso Eyring, en el cual, la energía de activación de Gibbs puede ser determinada del tiempo de vida del puente de hidrógeno. Se emplearon pequeñas trayectorias de 40 ps con un paso del tiempo de 0,5 femtosegundos (fs) sin restricciones de ahorro de las coordenadas cada 2 fs, lo que proveyó de altas resoluciones de tiempo para determinar el tiempo de vida de los puentes de hidrógeno y sus energías de activación.³⁰¹ La comparación de los valores para: agua, [Bmim][PF₆] and [Omim][PF₆] se presenta en la tabla 45. De ella se puede observar que las energías necesarias para romper un puente de hidrógeno es más alta en presencia de los LIs utilizados que en el caso del agua. Sin embargo, la constante cinética: K_D calculada a partir de esta interacción se ubica también en el rango milimolar y por ello sus valores son muy similares a los obtenidos en el estudio de SPR.

4.3. SÍNTESIS DE DISACÁRIDOS CON LA ENZIMA TTP0042 INMOVILIZADA

La enzima TTP0042 se inmovilizó de tres formas: I) sobre polímeros macroporosos como Eupergit CM y los polímeros sintetizados en el laboratorio del Prof. Rumero II) Polímeros de glioxil agarosas facilitados por el grupo del Prof. Guisán y III) CLEA's. Los resultados obtenidos en cada uno de estos experimentos se detallan a continuación.

4.3.1. Inmovilización de TTP0042 sobre polímeros macroporosos

Se evaluó la inmovilización de la enzima TTP0042 sobre polímeros funcionalizados con epóxidos, la estructura de los monómeros y la caracterización de los polímeros se presentó en el apartado 3.4.6.1. Inicialmente se utilizaron los ocho polímeros más hidrofílicos facilitados por el grupo del Prof. Dr. Angel Rumero, siendo tales polímeros llamados: 146K, 162R, 153A, 157I, 122B, 83H, 152A, 107M. Para este primer screening se utilizó el extracto clarificado de TTP0042 como enzima, tal y como lo ciertos varios autores,^{81, 127} ya que su pureza es muy alta y las otras proteínas presente en el extracto se consideran inertes por el tratamiento térmico a 80°C al cual se han expuesto durante la semi-purificación.

Tabla 46. Inmovilización de la enzima TTP0042 (extracto clarificado, 50 mg prot/g soporte) sobre polímeros macroporosos de naturaleza hidrofílica funcionalizados con grupos epóxidos.

Polímero	% enzima inmovilizada	Carga efectiva (mg prot./g Polímero)	Actividad U/mg enzima	Actividad U/ g polímero	Actividad retenida (%)
Enzima libre	N/A	N/A	70,1	N/A	100
146K	70	35	3,5	80,8	4,99
162R	86	43	2,8	80,2	3,99
153A	67	34	3,2	50,8	4,56
157I	43	22	1,6	22,6	2,28
122B	92	46	0,32	9,9	0,46
83H	67	34	0,25	5,5	0,36
152A	35	18	0,47	5,4	0,67
107M	46	23	0,11	1,7	0,16

Los resultados obtenidos muestran un grado aceptable de inmovilización de la enzima sobre los distintos soportes utilizados, dada la altísima carga de proteínas utilizada (50 mg enzima/gramo de polímero), se puede advertir que los polímeros están

suficientemente funcionalizados y con grandes áreas superficiales para poder inmovilizar las altas cantidades de enzima utilizadas. Sin embargo, las actividades retenidas de la enzima inmovilizada fueron sumamente bajas llegando como máximo a un 5% de retención de la actividad original con el polímero 146K (Tabla 46). Se decidió luego repetir la inmovilización utilizando los polímeros restantes (hidrofóbicos) con la finalidad de completar el screening de soportes, los polímeros utilizados en esta segunda etapa son: 67B, 103G, 112I, 116A, 133A, 143E, 159D, 162R, 163L y 146 K. en este caso, se decidió disminuir la carga enzimática en cinco veces (10 mg enzima/ gramo de polímero), utilizando en esta ocasión proteína pura. Además se seleccionaron los dos mejores polímeros del primer screening, para evaluar si las nuevas condiciones de inmovilización mejoran los resultados obtenidos. Los resultados de este segundo proceso de inmovilización se muestran en la tabla 47.

Tabla 47. Inmovilización de la enzima TTP0042 (enzima purificada, 10 mg prot/g soporte) sobre polímeros macroporosos de distinta naturaleza funcionalizados con grupos epóxidos.

Polímero	% enzima inmovilizada	Carga efectiva (mg prot./g Polímero)	Actividad U/mg enzima	Actividad U/ g polímero	Actividad retenida (%)
Enzima libre	N/A	N/A	326	N/A	100
Eupergit CM	90	9	1,08	10,8	0,33
67B	100	10	1,0	10	0,31
103G	97	9,7	0,46	4,6	0,14
112I	100	10	0,78	7,8	0,24
116A	97	9,7	0,64	6,4	0,20
133A	100	10	1,82	18,2	0,56
143E	53	5,3	1,0	10	0,31
159D	91	9,1	9,6	96	3,00
162R	97	9,7	12,4	124	3,80
163L	100	10	12,3	48	3,80
146K	100	10	9,2	92	2,80

De la información obtenida se comprobó que la inmovilización es completa en la mayoría de los casos, superando el 90% de anclaje en casi todos los casos, excepto con el soporte 143E donde la enzima solo se inmovilizó en un 53%. Sin embargo, pese a que la carga añadida a los soportes al parecer fue optimizada, se obtuvieron valores muy bajos de actividad enzimática retenida, que en ningún caso alcanzaron el 5%. Los soportes hidrofílicos probados en el primer screening (146K y 162R) mostraron altas actividades

en comparación con los demás soportes utilizados en este nuevo screening, mientras que de los soportes hidrofóbicos, el polímero 159 D mostró los mejores resultados. Por su parte, el eupergit C mostró ser un polímero capaz de inmovilizar hasta un 90% de la carga utilizada pero sin capacidad de retener actividad en la enzima inmovilizada (0,33%).

4.3.1.1. Estudio de mejora del proceso de inmovilización sobre soportes macroporosos.

Los resultados obtenidos en el screening presentado en el apartado anterior, llevaron a considerar posibles factores que afectan directamente actividad de la enzima implicados durante la inmovilización, pues el máximo de actividad retenida estuvo cerca del 5%. Por ello, se hicieron pruebas preliminares para evaluar los efectos de la liofilización, el agente de bloqueo de epóxidos libres (glicina), salinidad del tampón de inmovilización (500 mM NaCl y 50 mM Tris/HCl pH 7,30), y pH de inmovilización considerando la mejora de los grupos amino libres a valores de pH más alcalinos. Se realizaron las siguientes actividades para medir su efecto sobre la inmovilización de la enzima en el polímero 163L ya que es uno de los mejores soportes de inmovilización:

- **A:** Inmovilización convencional: Se le considera convencional, por que en su protocolo incorpora varias pautas para garantizar la inmovilización de la enzima y el bloqueo de epóxidos libres, constituyendo el protocolo de referencia en el trabajo de inmovilización. Para ello se utilizó tampón 50 mM Tris/HCl pH 7,30 500 mM NaCl con glicina 3 M pH 8,50 añadida posteriormente para bloquear epóxidos libres.
- **B:** Inmovilización en tampón fosfato de sodio 50 mM pH 7,0: para evaluar el efecto parcialmente negativo que posee el tampón Tris/HCl según la literatura.⁷² El bloqueo posterior se realizó con glicina
- **C:** Inmovilización en tampón fosfato de sodio 50 mM pH 7,0 con bloqueo posterior utilizando β -mercaptoetanol (1M) como agente de bloqueo.
- **D:** Inmovilización en tampón fosfato de sodio 50 mM pH 6,0, con bloqueo posterior utilizando glicina.
- **E:** Inmovilización en tampón fosfato de sodio 50 mM pH 6,0 con bloqueo posterior utilizando β -mercaptoetanol (1M) como agente de bloqueo.

El estudio de mejora del proceso de inmovilización (Tabla 48) denotó que las condiciones de referencia (**A**) retienen un 3,14% de la actividad enzimática total. Siendo este dato superado por los procesos **C** y **E**. El proceso **C** fue el proceso con mejor retención de actividad y se caracterizó por suprimir el bloqueo posterior con glicina a pH 8,50 durante 16 horas, en su lugar se utilizó otro agente de bloqueo (mercaptoetanol, a pH 7,0). Mientras que el proceso **E** sigue las mismas pautas del proceso **C** pero con un bloqueo de mercaptoetanol a pH 6,0. Los procesos **B** y **D** confirman la idea de que el bloqueo posterior con glicina (**D**) afecta la enzima y de que el tampón Tris/HCl (**B**) suele ser poco recomendado para esta glicosidasa, tal y como se ha descrito en la literatura.⁷²

Tabla 48. Estudio del efecto del proceso de inmovilización sobre la actividad hidrolítica de la enzima TTP0042 sobre el soporte 163L. Las actividades se midieron en un medio 1 mM a 65°C.

Proceso	Actividad U/mg enzima	Actividad U/ g polímero	Actividad retenida (%)
A	2,20	44	3,14
B	0,64	12,2	0,91
C	5,97	110	8,51
D	0,60	11,6	0,86
E	2,6	48	3,71
Enzima libre	70,1	N/A	100

Los resultados de este estudio desprenden ligeras mejoras entorno al proceso de inmovilización, indicando que el tampón fosfato de sodio 50 mM pH 7,0 es el mejor medio para inmovilizar la enzima y el bloqueo con β -mercaptoetanol es mejor que el bloqueo con glicina.

4.3.1.2. Estudio de estructura proteica e inmovilización

Dada la baja actividad hidrolítica de la enzima inmovilizada, se analizó la distribución de lisinas de la enzima TTP0042 (figura 63), resultando que todas las lisinas (5 en total) están detrás del centro activo, es decir, la inmovilización por lisinas no tocaría el centro activo ni sus cercanías, además su ubicación está al menos a 15 Å del centro catalítico, por lo que una inmovilización basada en la unión covalente con residuos de lisinas no debería afectar significativamente la estructura del centro activo de la enzima.

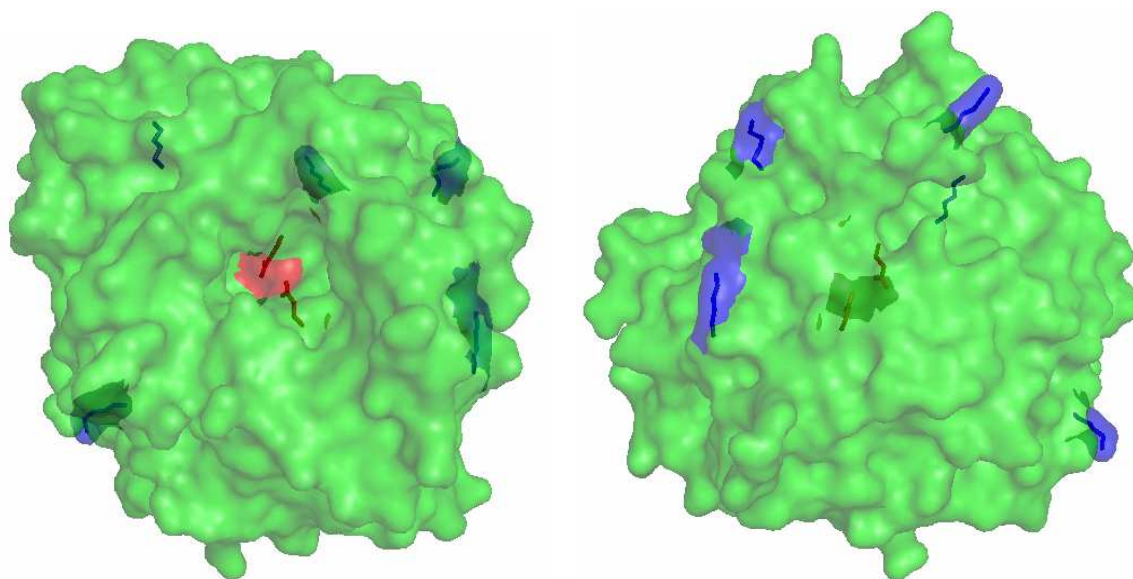


Figura 63. Distribución relativa de lisinas (en azul) sobre la superficie de la enzima TTP0042. El centro activo se muestra en color rojo. De la estructura se puede apreciar que las lisinas están en la parte de atrás de la enzima respecto a la entrada al centro activo.

4.3.1.3. Diseño de mutantes de TPP0042

Se valoró además la ubicación de las cisteínas, aminoácidos que no son abundantes en las enzimas termófilas debido a su reactividad, pero que serían susceptibles a reaccionar con los epóxidos. El resultado indicó que existen dos cisteínas, una de ellas: Cys-167 muy cerca del centro activo de la enzima. Este último dato llevó a pensar que la sustitución de la cisteína por otro aminoácido podría mejorar los resultados en la inmovilización. Es aquí donde se decide llevar a cabo dos opciones: I) Realizar mutagénesis dirigida de la enzima para obtener un mutante en el que la cisteína esté sustituida por una serina (C167S), ya que el grupo hidroxilo sería menos reactivo que el de la cisteína y la polaridad sería similar. II) Se decidió comparar los centros catalíticos de varias enzimas y elegir un aminoácido presente en otras proteínas homologas que carecen de la cisteína. Los resultados mostraron a la valina como un sustituto natural de la cisteína para este centro activo, por lo que se diseñó un segundo mutante con una valina en la posición 167 (C167V).

Los mutantes diseñados fueron evaluados por su actividad catalítica en la enzima libre y su actividad aparece registrada en la tabla 49. De ella se observa en primer lugar que ambos mutantes poseen una muy baja actividad enzimática, llegando a presentar como máximo

un 25% de la actividad de la enzima libre (C167V). En segundo lugar, cabe señalar que el mutante con mayor actividad es el mutante diseñado con los parámetros de homología con otras enzimas, mostrando que es más eficiente la sustitución por valina que por serina.

Tabla 49. Actividades enzimáticas de los mutantes diseñados. Las actividades se midieron a 60°C, en tampón fosfato de sodio 50 mM pH 7,0 y 5 mM de *p*NF-β-Gal con el método directo.

Enzima	Actividad (U/mg)	% actividad (prot. nativa)
TTP0042	76,20	100
TTP0042 C167V	19,24	25,25
TTP0042 C167S	2,34	3,07

4.3.1.4. Inmovilización de enzimas mutantes de TTP0042 sobre polímeros macroporosos

Los mutantes diseñados de TTP0042 fueron sometidos a inmovilización sobre el polímero 163L dado que es uno de los polímeros que registra mejor retención de actividad enzimática entre los polímeros estudiados. Se ensayaron diferentes condiciones de pH y distintos tampones, todos ellos en concentración 50 mM con NaCl 500 mM para evaluar posibles efectos de la inmovilización sobre la actividad de los mutantes. Además se suprimió el uso de glicina como agente de bloqueo.

Tabla 50. Inmovilización de mutantes de TTP0042 sobre el polímero 163L.

Mutante	Tampón	pH	% enzima inmovilizada	Actividad (U/mg prot.)	% Actividad retenida
C167S	Fosfato de sodio	7,0	100	--	0
C167V	Fosfato de sodio	7,0	100	5,84	30
C167V	Tris/HCl	7,3	100	--	0
C167V	Carbonato de sodio	10	95	--	0
C167V	Tris/HCl	10	93	--	0
TTP0042	Fosfato de sodio	7,0	100	5,97	8,5

Los resultados de la tabla 50 muestran que nuevamente el polímero es capaz de inmovilizar más de un 90% de la proteína añadida, sin embargo la retención de la actividad es ligeramente mejor con el mutante C167V que logró conservar un 30%

mientras la actividad inicial, lo que significa que la cisteína de la enzima nativa afecta su actividad luego de ser inmovilizada y por ello el mutante diseñado retiene un mayor porcentaje de actividad, sin embargo, el papel que desempeña la cisteína 167 en la enzima original es crucial, dada la gran actividad hidrolítica de dicha enzima respecto a los mutantes.

Por su parte, la enzima nativa en condiciones normales retiene como máximo un 8,5% de actividad. Sin embargo, en términos absolutos, las unidades enzimáticas inmovilizadas con el mutante C167V y la enzima libre son prácticamente iguales, por lo que los mutantes diseñados no mostraron mejoras visibles en el proceso de inmovilización respecto a la enzima nativa.

4.3.1.5. Estudio de inhibidores competitivos

Dados los resultados obtenidos con los mutantes, se decidió evaluar otras metodologías de inmovilización para utilizar estos polímeros como soportes para la enzima TTP0042. En este caso se optó por bloquear el centro activo de la enzima utilizando inhibidores enzimáticos competitivos durante la inmovilización para evitar el acceso de la cisteína 167 hacia los epóxidos. Los posibles inhibidores utilizados fueron la lactosa que podría causar inhibición por sustrato y la galactosa que podría causar la inhibición por producto. Se analizó la actividad hidrolítica de la enzima TTP0042 en presencia de distintas concentraciones de cada inhibidor, con ellas se graficaron el inverso de la velocidad enzimática respecto la concentración de inhibidor utilizada (figuras 64 y 65).

Inmovilización en presencia de inhibidores competitivos

La búsqueda de inhibidores competitivos mostró que la galactosa y la lactosa disminuyen la actividad de la enzima, lo que supone que podrían funcionar como agentes de bloqueo en el centro activo. Primeramente se inmovilizó la enzima en presencia de inhibidores enzimáticos (2,5% m/v de cada azúcar: galactosa y lactosa) utilizando extractos semipurificados (por choque térmico), con la finalidad de evaluar el efecto de otras proteínas accesorias en el preparado enzimático y posteriormente poder contrastar éstos datos con el mismo proceso repetido con la enzima pura de la enzima TTP0042 con una

carga enzimática de 20 mg de enzima por gramo de soporte debido a su baja actividad específica.

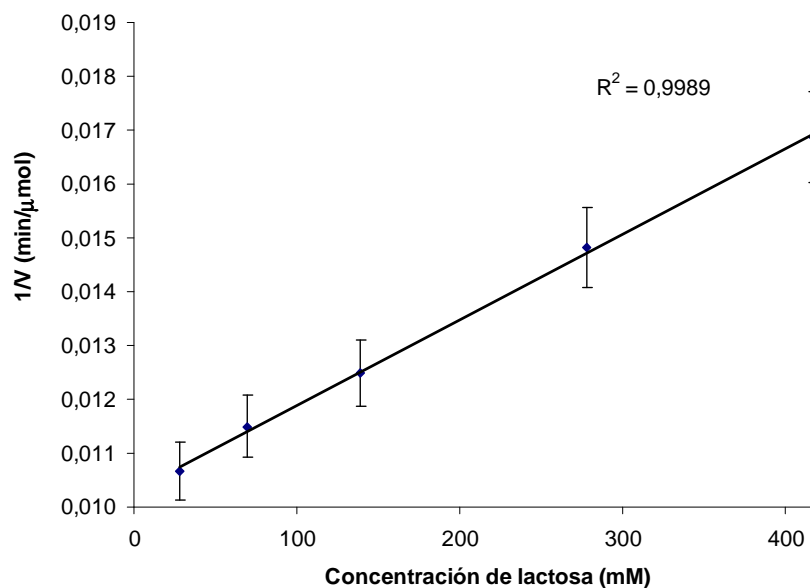


Figura 64. Gráfico de Dixon para la inhibición enzimática de TTP0042 utilizando lactosa como agente inhibidor de la actividad hidrolítica sobre pNF-β-Gal.

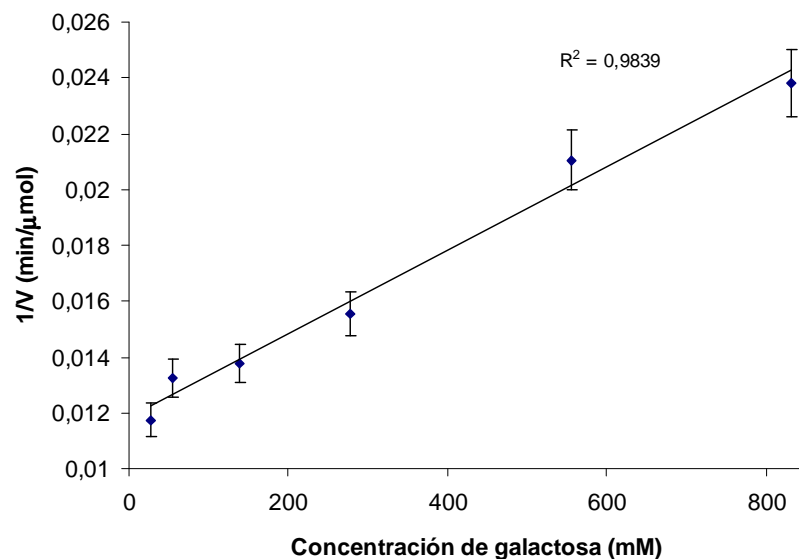


Figura 65. Gráfico de Dixon para la inhibición enzimática de TTP0042 utilizando galactosa como agente inhibidor de la actividad hidrolítica sobre pNF-β-Gal.

A éstos extractos se les analizó su actividad y su anclaje sobre los polímeros con mejores resultados: 146K, 159D y 162R. Para evaluar el efecto de la glicina sobre la inmovilización, se decidió realizar el tratamiento con una muestra testigo sin realizar el

bloqueo con glicina y otra en presencia de glicina 3M (pH 8.5, durante 18 horas). Como polímero de referencia se utilizó Eurpegit C. Posteriormente se repitieron los mismos ensayos utilizando la enzima pura utilizando una carga enzimática de 10 mg de enzima pura por gramo de soporte dada la mayor actividad específica de la enzima pura.

Inmovilización de extractos semipurificados sin usar glicina

Se utilizaron extractos semipurificados de la enzima TTP0042 pero dado que su actividad específica es más baja que la de la enzima pura, se decidió emplear una carga de 20 mg de enzima por cada gramo de soporte. En esta primera fase se decidió no utilizar glicina como agente de bloqueo. Estos datos se muestran en la tabla 51.

Tabla 51. Inmovilización de extractos semipurificados de la enzima TTP0042 en presencia de inhibidores competitivos y sin usar glicina como bloqueador. La carga utilizada fue de 20 mg de proteína por cada gramo de soporte.

Polímero	Bloqueo centro activo	% Inmovilización	% Actividad Retenida
146K	galactosa	100	2.3
146K	lactosa	100	2.5
159D	galactosa	100	4.5
159D	lactosa	60	3.6
162R	galactosa	100	6.2
162R	lactosa	100	6.3
Eupergit CM	galactosa	70	0
Eupergit CM	lactosa	70	0

Los resultados obtenidos confirman la tendencia a una inmovilización muy alta de las proteínas añadidas al soporte, excepto en el Eupergit CM donde una carga de 20mg/g parece saturar la capacidad del soporte. Sin embargo, en todos los casos se alcanzan bajos niveles de retención de actividad, sobretudo en el Eupergit CM que mostró nula actividad. De los polímeros utilizados los mejores resultados se obtuvieron en el polímero 162R.

Inmovilización de extractos semipurificados en presencia de glicina

Los resultados obtenidos al realizar el mismo experimento con extractos clarificados de TTP0042 en ausencia de glicina (tabla 52) son similares en cuanto a la inmovilización total de proteínas pero alcanzan bajos niveles de retención de actividad, aún más bajos que los resultados en ausencia de glicina, lo que muestra que el uso de la glicina como agente de bloqueo afecta a la enzima inmovilizada sobre el soporte.

Tabla 52. Inmovilización de extractos semipurificados de la enzima TTP0042 en presencia de inhibidores competitivos y con adición de glicina como bloqueador. La carga utilizada fue de 20 mg de proteína por cada gramo de soporte.

Polímero	Bloqueo centro activo	% Inmovilización	% Actividad Retenida
146K	galactosa	100	1.1
146K	lactosa	100	1.5
159D	galactosa	100	1.2
159D	lactosa	60	1.1
162R	galactosa	100	0.9
162R	lactosa	100	1.4
Eupergit CM	galactosa	70	0.2
Eupergit CM	lactosa	70	0.6

Inmovilización de la enzima pura sin usar glicina

El mismo ensayo de actividad realizado con los extractos semipurificados de TTP0042 se repitió con la enzima purificada para determinar variaciones en el rendimiento de la actividad retenida luego de la inmovilización. En primer lugar se repitió sin usar glicina, con una carga de 10 mg de enzima/gramo de soporte. Se utilizaron los mismos soportes y las mismas cantidades de los inhibidores. Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 53.

Tabla 53. Inmovilización de la enzima TTP0042 (purificada) en presencia de inhibidores competitivos y sin usar glicina como bloqueador.

Polímero	Bloqueo centro activo	% Inmovilización	% Actividad Retenida
146K	galactosa	100	7.2
146K	lactosa	100	3.4
159D	galactosa	100	21.2
159D	lactosa	100	2.5
162R	galactosa	100	5.9
162R	lactosa	100	2.0
Eupergit CM	galactosa	53	0.5
Eupergit CM	lactosa	53	0.7

Los resultados de este experimento muestran una completa inmovilización de la enzima sobre los soportes excepto el Eupergit C, los mejores valores de actividad se obtienen cuando el agente de bloqueo es la galactosa, excepto para el Eupergit C que muestra una diferencia pequeña entre ambos valores ensayados. El mejor polímero para inmovilizar la enzima es el 159D llegando a mostrar un 21% de actividad retenida, siendo este valor el más alto obtenido con este tipo de polímeros.

Inmovilización de la enzima pura en presencia de glicina

El mismo ensayo de actividad realizado con la enzima pura se repitió para determinar el efecto de la glicina como agente posterior de bloqueo de los epóxidos libres. Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 54.

Tabla 54. Inmovilización de de la enzima TTP0042 (purificada) en presencia de inhibidores competitivos utilizando glicina como bloqueador.

Polímero	Bloqueo centro activo	% Inmovilización	% Actividad Retenida
146K	galactosa	100	4.5
146K	lactosa	100	2.1
159D	galactosa	100	2.0
159D	lactosa	100	2.6
162R	galactosa	100	1.0
162R	lactosa	100	7.6
Eupergit CM	galactosa	53	0.9
Eupergit CM	lactosa	53	0.6

Al realizar de nuevo el experimento con la enzima pura se obtiene que el tratamiento posterior en presencia de glicina nuevamente disminuye la retención de la actividad en todos los casos produciendo menores rendimientos en la inmovilización excepto en el polímero 162R, que retiene un porcentaje relativamente alto de actividad entre los polímeros analizados cuando se utiliza lactosa como agente de bloqueo. Sin embargo se concluye que la mejor forma de inmovilizar de esta enzima es en ausencia de glicina y en presencia de un 2,5% de galactosa.

4.3.2. Inmovilización de TTP0042 sobre glioxil agarosas

Debido a que los mejores resultados obtenidos en la inmovilización de TTP0042 sobre polímeros macroporosos no superan el 21% de actividad enzimática, pese a inmovilizar toda la proteína añadida, se decidió explorar otros soportes para inmovilizar la enzima. puesto que la alta reactividad de los epóxidos hacia distintos grupos funcionales como aminos, tioles y fenoles les hacen poco específicos para un anclaje covalente apropiado. Tomando en cuenta que la enzima TTP0042 posee 5 lisinas en el sector opuesto a la entrada del centro activo, se consideró que el uso de un agente específico que reaccione con éstas aminos permitiría obtener una adecuada inmovilización de la enzima, en este caso, un soporte funcionalizado con grupos aldehídos. Por ello, el uso de glioxil agarosas²²⁰ se postuló como una alternativa más viable para inmovilizar la enzima TTP0042 que el uso de los soportes funcionalizados con epóxidos.

4.3.2.1. Screening de agarosas funcionalizadas

Se utilizaron cuatro tipos de soportes basados en agarosas (Ver esquema 11), todos ellos facilitados por el grupo del Prof. Guisán. Se evaluaron las glioxil agarosas normales (GX)²²⁰ y las agarosas funcionalizadas con grupos catiónicos, aniónicos y de metales quelatados como níquel (II).²²² Se evaluaron los cuatro soportes de agarosas antes mencionados para inmovilizar la enzima TTP0042, los resultados mostraron que el mejor soporte de inmovilización es la glioxil agarosa tradicional con un alto porcentaje de inmovilización y alta retención de la actividad enzimática. Los otros soportes presentaron bajos niveles de retención de actividad, aunque en el caso de GX-IDA y GX-catiónico se obtuvieron importantes niveles de inmovilización.

Tabla 55. Rendimiento de la inmovilización de la enzima TTP0042 sobre polímeros de agarosa funcionalizada con grupos aldehídos.

Polímero	Inmovilización (%)	Actividad relativa (%)
GX-Agarosa	98	92,7
GX-IDA-Ni ²⁺	93	4,8
GX-Agarosa-Catiónico	100	39
GX-Agarosa-Aniónico	56	<1

Los resultados obtenidos (Tabla 55) son congruentes con la estructura de la enzima y el tipo de inmovilización. En primer lugar la abundante presencia de lisinas en la parte opuesta al centro activo de la enzima (figura 63) facilita que la enzima se oriente hacia el soporte por detrás del centro activo, dejando expuesta la entrada al mismo. Lo que explica una adecuada inmovilización con el soporte de GX-agarosa.

Por otra parte, los resultados obtenidos son bastante inferiores en cuanto a inmovilización y retención de la actividad enzimática cuando se utilizan otras formas de agarosas. La explicación más probable se debe a que los otros tipos de soportes orientan la enzima en direcciones donde la presencia de lisinas no parece ser importante, alcanzando bajos niveles de inmovilización o evitan un acercamiento adecuado de la enzima al soporte produciendo bajos niveles de actividad en el derivado inmovilizado.

Los valores más altos de actividad en éstos soportes (39%) se obtienen al usar soportes de agarosa catiónica, donde se requiere que la enzima se acerque por cargas negativas en su superficie, algo que en las condiciones de inmovilización utilizadas es factible, pues la enzima TTP0042 (incluyendo la cola de histidinas) posee un punto isoeléctrico teórico de 6,23 (ProtParam, Swiss Institute of Bioinformatics), bajo estas condiciones, el pH de inmovilización utilizado (7,00) es muy cercano al punto isoeléctrico y con ello la enzima posee pocas cargas negativas en su superficie. El soporte aniónico da resultados aún más bajos debido a que la carga neta negativa en la superficie de la enzima repele las cargas negativas del soporte, generando una inmovilización bastante limitada. Finalmente el soporte funcionalizado con níquel (II) orienta a la enzima hacia una disposición espacial basada en la cola de histidinas que no necesariamente corresponde a la mejor disposición para garantizar el acceso del sustrato al centro activo.

4.3.2.2. Estudio de carga

De el screening anterior se seleccionó el mejor polímero de los anteriores: GX y se estudiaron diferentes valores de carga de proteína para inmovilizar sobre la enzima. Se añadieron 5, 10, 20, 30, 40 y 50 mg de proteína por gramo de soporte. Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 56. De ellos se puede concluir que el rango óptimo de carga para inmovilizar la enzima TTP0042 sobre el soporte va desde 5 hasta 20 mg/g, posterior a este rango se obtienen valores muy bajos de actividad enzimática, debidos quizás, a problemas difusionales de la enzima que le impiden alcanzar los grupos funcionales que están activos sobre la superficie del soporte.

Tabla 56. Rendimiento de la inmovilización de la enzima TTP0042 sobre polímeros de agarosa funcionalizada con grupos aldehídos.

Carga (mg enzima/ g soporte)	Inmovilización (%)	Actividad relativa (%)
5	98%	90%
10	98%	86%
20	98%	88%
30	98%	61%
40	89%	44%
50	86%	41%

4.3.2.3. Influencia del pH

La mayor parte de las enzimas modifican su intervalo de pH de trabajo cuando se inmovilizan,^{218, 236} normalmente el proceso de inmovilización mejora su estabilidad y modifica los residuos de la superficie enzimática que facilitan la tolerancia a determinados valores de pH, por ello se decidió medir el efecto del pH sobre la actividad enzimática de la enzima.

Los resultados obtenidos en este experimento se muestran en la figura 66. De ellos es posible inferir que la enzima inmovilizada posee una tendencia a desempeñarse mejor en valores de pH ligeramente más ácidos, se observa un ligero desplazamiento del pH óptimo hasta 5,50 en la enzima inmovilizada mientras que en la enzima original es de 6,00. Además se muestra una mejora en la resistencia a valores de pH más ácidos como

4,50 donde la enzima inmovilizada retiene un 90% de actividad mientras que la enzima libre retiene un 54%, esto parece ser una mejora de la estabilización de la enzima. Sin embargo cabe mencionar que la enzima inmovilizada mostró menor resistencia a valores de pH alcalinos pero de forma poco pronunciada y manteniendo la tendencia original de la enzima libre.

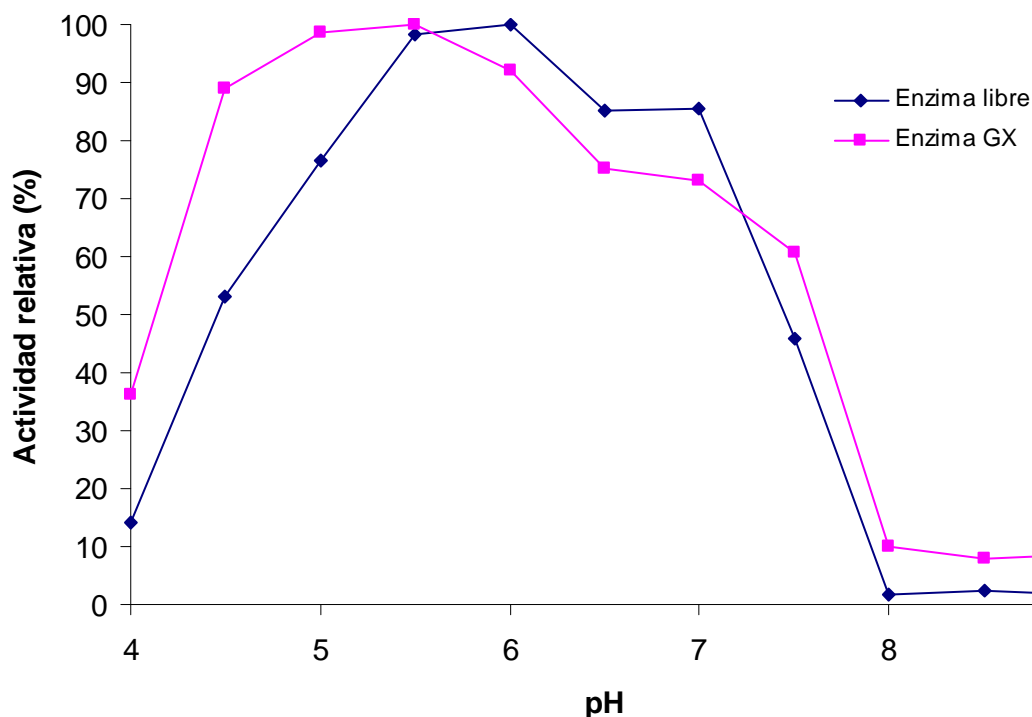


Figura 66. Efecto del pH sobre la actividad enzimática de TTP0042 (libre e inmovilizada sobre GX). La actividad se midió con agitación magnética por hidrólisis de *p*NF- β -Gal 5 mM a distintos valores de pH por el método indirecto luego de 10 minutos de hidrólisis.

4.3.2.4. Estabilidad térmica

La estabilización de la enzima sobre el soporte se midió en función de la estabilidad térmica a 70°C, 80°C y 90°C utilizando un medio acuoso de fosfato de sodio 50 mM pH 6,00 y una concentración final de 0,075 mg/mL de β -galactosidasa libre e inmovilizada. En función de la velocidad de inactivación, se retiraron de forma periódica muestras de disolución (enzima libre) o suspensión (enzima inmovilizada) y se midió su actividad hidrolítica por el método directo a pH 7,00, 80°C y 5 mM de *p*NF- β -Gal. Los resultados obtenidos se muestran en las figuras 67, 68 y 69.

A 70°C la enzima libre muestra una alta estabilidad, sin embargo su estabilidad es superada por la enzima inmovilizada cuando han transcurrido doce horas de incubación,

(figura 67) posterior a este periodo la enzima se comporta claramente más estable por la inmovilización sobre agarosa.

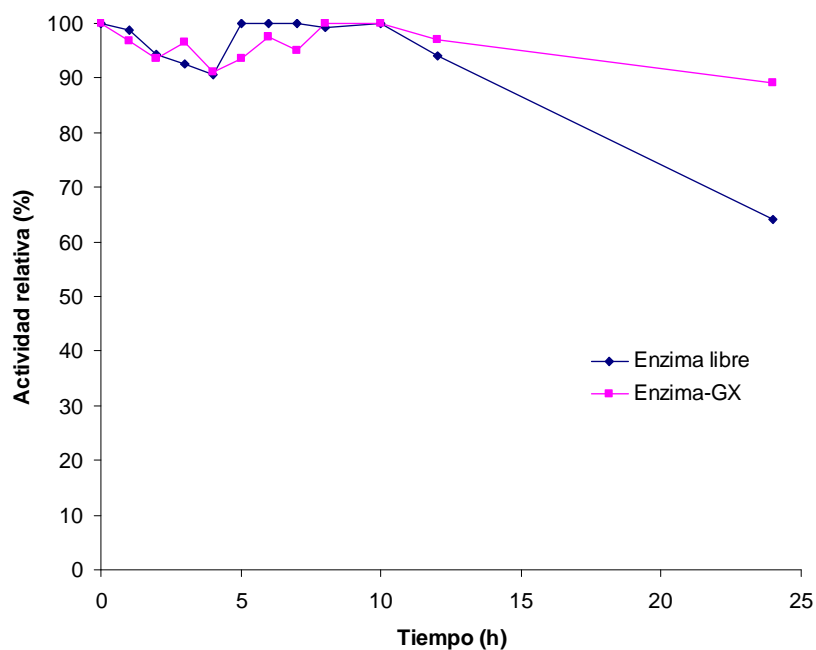


Figura 67. Estabilidad térmica de la enzima TTP0042 y GX-TTP0042 en tampón fosfato de sodio 50 mM pH 6,00 a 70°C.

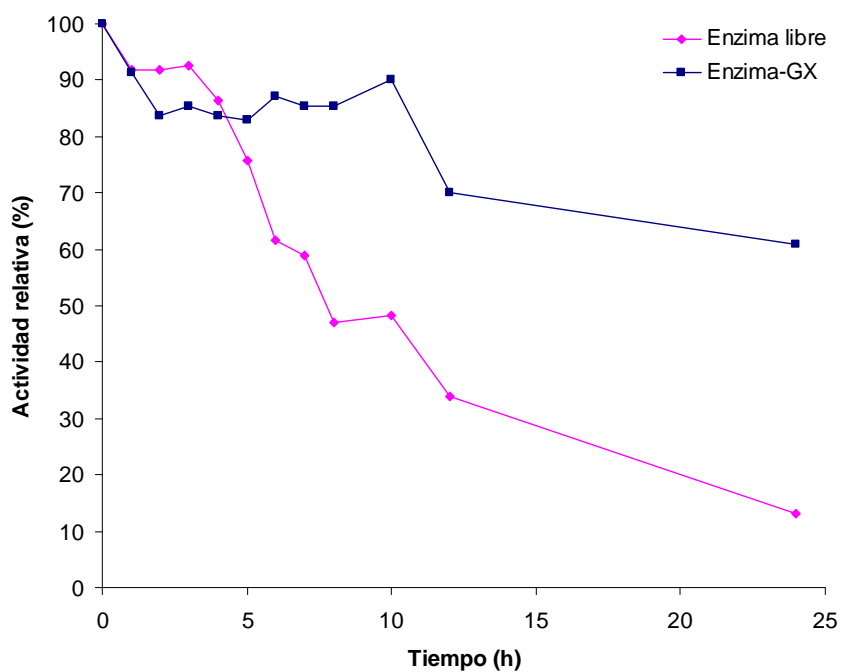


Figura 68. Estabilidad térmica de la enzima TTP0042 y GX-TTP0042 en tampón fosfato de sodio 50 mM pH 6,00 a 80°C.

A 80°C (Figura 68), los cambios son visibles en periodos de tiempo más cortos, pues a las 5 horas de incubación es posible observar una inactivación de la enzima libre respecto a la enzima inmovilizada. Transcurridas 10 horas, la enzima libre tiene menos de la mitad de su actividad original (45%) mientras que la enzima inmovilizada posee cerca del 90% de su actividad. (Figura 68).

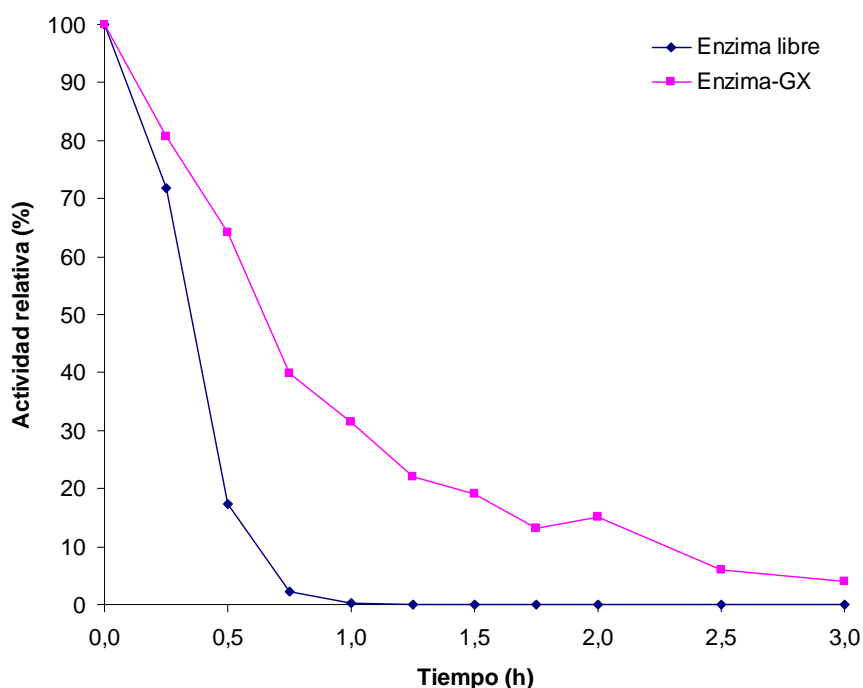


Figura 69. Estabilidad térmica de la enzima TTP0042 y GX-TTP0042 en tampón fosfato de sodio 50 mM pH 6,00 a 90°C.

Los resultados de la figura 69 muestran una inactivación muy rápida, que concuerda con la literatura existente de esta enzima, ya que por encima de los 80°C la enzima comienza a desactivarse por efecto de las altas temperaturas.^{13, 70} Según Dion y colaboradores,⁷² a 90°C la enzima se inactiva con una vida media de menos de 10 minutos, sin embargo, existen antecedentes^{13, 70} que muestran que la enzima tiende a comportarse diferente en los ensayos de estabilidad térmica en función de su concentración, probablemente debido a que forma agregados.

En el caso estudiado, la concentración utilizada: 0,075 mg/mL parece ser ligeramente alta respecto a la de estudios anteriores, generando una vida media de la enzima libre a 90°C superior a los 20 minutos pero con una inactivación total a los 60 minutos. En el caso de

la enzima inmovilizada, la vida media a 90°C está cerca de los 45 minutos bajos las condiciones utilizadas y luego de 3 horas la actividad retenida es menor al 10%.

4.3.2.4. Efecto de la temperatura en las reacciones de transglicosilación:

Se estudio la influencia de la temperatura en las reacciones de transglicosilación, debido a que la enzima al ser termófila puede trabajar a distintas temperaturas, en las condiciones óptimas de reacción (0,17 M de *p*NF-β-Gal y 0,85 M de GlcNAc), por tanto, las reacciones de transglicosilación se realizaron a: 30, 40, 50, 60, 70 y 80 °C. Se cuantificó la síntesis de Galβ(1→4)GlcNAc en función de la temperatura así como el de las otras reacciones que compiten con la síntesis, como son: la autocondensación del donador y la hidrólisis.

Síntesis de Galβ(1→4)GlcNAc en función de la temperatura:

La síntesis de Galβ(1→4)GlcNAc se favorece a 60°C. Este valor corresponde al punto intermedio de todas las temperaturas estudiadas. En todos los casos, la enzima inmovilizada posee mayor actividad en la síntesis de este disacárido respecto a la enzima libre (figura 70), a su vez, la enzima libre tiende a mantener constante la síntesis del disacárido sin verse afectada por la temperatura.

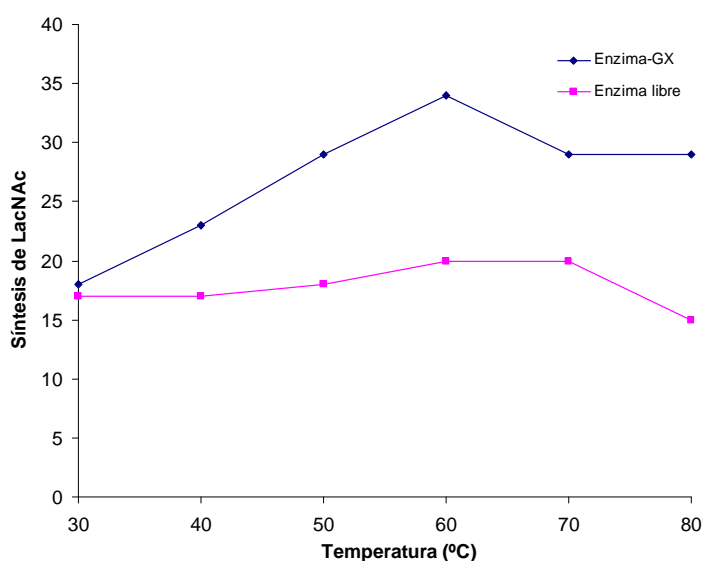


Figura 70. Síntesis de Galβ(1→4)GlcNAc en función de la temperatura, utilizando la enzima TTP0042 libre e inmovilizada.

Síntesis de productos de autocondensación en función de la temperatura:

Una de las reacciones menos deseables en el uso de la enzima TTP0042 es la autocondensación del donador.⁸³ El principal producto de autocondensación obtenido es el Gal- β (1 \rightarrow 3)-Gal- β -pNF y como producto secundario el Gal- β (1 \rightarrow 6)-Gal- β -pNF. El estudio de temperaturas realizado, muestra que la enzima libre muestra una tendencia a sintetizar el autocondensado a altas temperaturas, llegando hasta un 70% de este compuesto a 80°C mientras que la enzima inmovilizada muestra la misma tendencia aunque menos pronunciada sintetizando como máximo un 46% a 80°C, pero en todo caso la síntesis del producto de autocondensación es favorecida a altas temperaturas con ambas enzimas. (Figura 71)

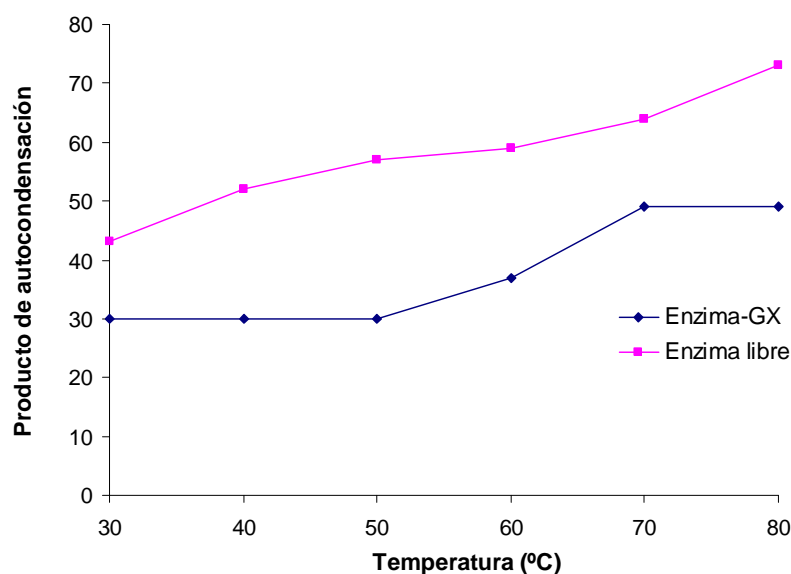


Figura 71. Síntesis de Gal- β (1 \rightarrow 3)-Gal- β -pNF en función de la temperatura utilizando la enzima TTP0042 libre e inmovilizada.

Hidrólisis de disacárido en función de la temperatura:

La enzima por naturaleza propia tiene la capacidad de hidrolizar sustratos. Esta capacidad es favorecida a bajas temperaturas y muestra una tendencia completamente inversa a la presentada por el producto de autocondensación. (Figura 72)

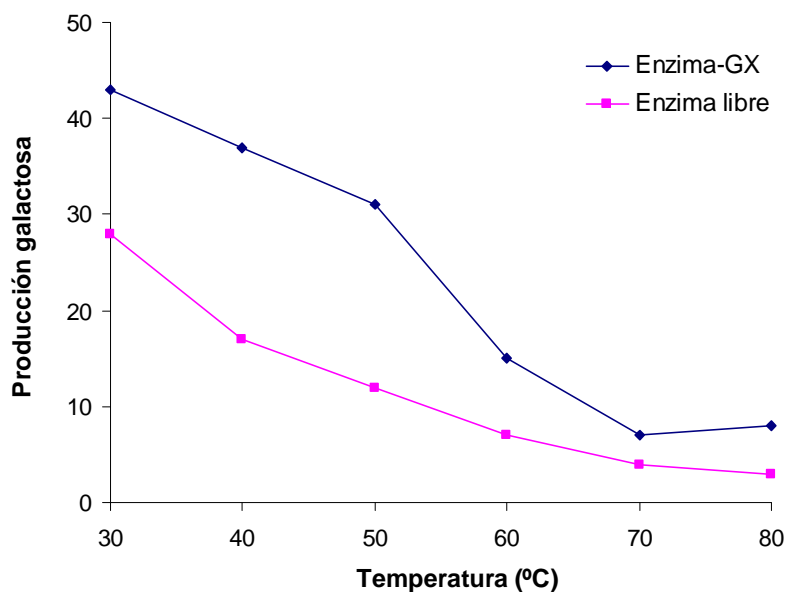


Figura 72. Hidrólisis de p NF- β -Gal en función de la temperatura utilizando la enzima TTP0042 libre e inmovilizada.

La hidrólisis se favorece como máximo a 30°C tanto para la enzima libre (28%) como para la enzima inmovilizada (43%) y se desfavorece con el incremento de la temperatura. Llegando a ser poco apreciable a 80°C donde solo aporta cerca del 10% de los productos de reacción para la enzima inmovilizada y 4% para la enzima libre. En todo caso, la tendencia general, muestra que la enzima inmovilizada es más hidrolítica que la enzima libre.

4.3.2.5. Síntesis de Gal β (1 \rightarrow 4)GlcNAc utilizando la enzima GX-TTP0042 en presencia de Líquidos Iónicos

Una vez caracterizada la enzima GX-TTP0042, se decidió repetir la reacción de síntesis de Gal β (1 \rightarrow 4)GlcNAc en presencia de líquidos iónicos. Se evaluaron tres líquidos iónicos derivados del imidazolio: [Bmim][PF₆], [Bmim][FAP] y [Emim][BF₄]. Se realizaron las reacciones de transglicosilación a 60°C y con la enzima libre e inmovilizada, en presencia de un 30% m/v de cada uno de éstos líquidos.

Los resultados obtenidos en la síntesis de Gal β (1 \rightarrow 4)GlcNAc en presencia de LIs se muestran en la tabla 57. De ella es posible asumir que la enzima inmovilizada es afectada positivamente hacia la síntesis de disacárido en presencia de líquidos iónicos, lo que sugiere que el efecto de cambio conformacional detectado con la enzima libre se mantiene aún cuando la enzima está unida covalentemente al soporte, sin embargo, no existen mejoras significativas respecto a los valores iniciales obtenidos con la enzima libre, ya que el margen de rendimiento del disacárido está como máximo en un 75% de LacNAc utilizando el líquido [Emim][BF₄]. Resulta importante señalar que el líquido [Bmim][PF₆] favoreció la síntesis del disacárido β (1 \rightarrow 6) produciendo hasta un 47% del mismo, algo que con la enzima libre se obtuvo utilizando el líquido iónico [CPMA][MeSO₄]. Este dato muestra que los líquidos iónicos también pueden modificar las tendencias de regioselectividad de la enzima, algo que antes ha sido descrito con otros disolventes como los derivados del glicerol y de la dimetilamina en la β -galactosidasa de *Biolacta*.^{438, 459}

Tabla 57. Síntesis de Gal β (1 \rightarrow 4)GlcNAc en presencia de líquidos iónicos utilizando la enzima TTP0042 inmovilizada sobre glioxil agarosas.

Cosolvente	Autocondensado β [1 \rightarrow 3]	Autocondensado [1 \rightarrow 6]	Galactosa	Disacárido β [1 \rightarrow 4]	Disacárido β [1 \rightarrow 6]
Tampón	31	13	7	32	17
[Bmim][PF ₆]	0	0	37	16	47
[Bmim][FAP]	63	9	3	21	4
[Emim][BF ₄]	10	3	3	75	9

4.3.2.6. Reutilización de la enzima GX-TTP0042

Se investigó el reuso de la enzima GX-TTP0042 en la síntesis de Gal β (1 \rightarrow 4)GlcNAc tanto en buffer como en presencia de 10% m/v de [CPMA][MeSO₄] a 60°C. Para ello se recuperó el catalizador luego de una hora de reacción, se lavó y secó nuevamente. En función de la masa recuperada de catalizador se añadieron nuevamente los reactivos manteniendo la misma proporción de enzima, donador y aceptor usados en el estudio de transglicosilación. La temperatura seleccionada para realizar los reusos fue 60°C, dado que es la temperatura óptima en la síntesis de dicho disacárido.

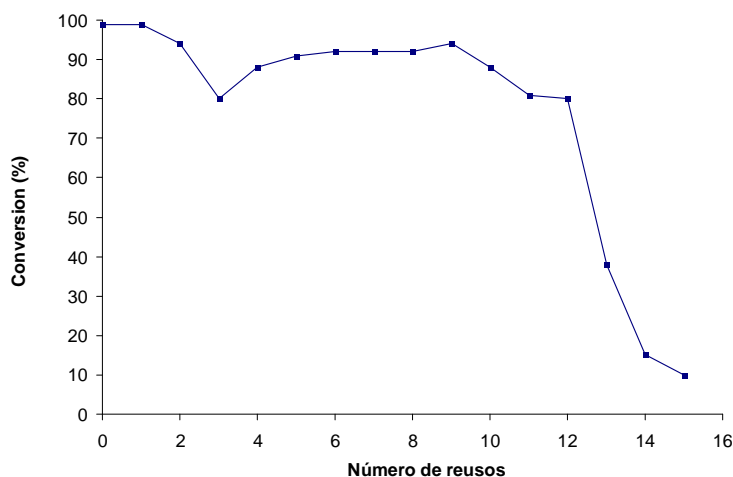


Figura 73. Estudio de reusos de la enzima GX-TTP0042 a 60°C en la síntesis de Gal β (1 \rightarrow 4)GlcNAc.

La enzima en medio acuoso tamponado mantiene una conversión (medida como el consumo total del reactivo limitante *p*NF- β -Gal) de más del 90% durante los primeros 9 reusos (figura 73). La conversión es superior al 80% hasta el reuso 13, sin embargo en ese momento se observó una dramática pérdida de actividad que culmina con un 10% de conversión a los 15 reusos. La enzima inmovilizada en presencia de 10% m/v de [CPMA][MeSO₄] se desactiva de forma gradual y ligeramente más rápido que la enzima en buffer (figura 74). Al parecer, el líquido iónico utilizado podría afectar la naturaleza del polímero del soporte, pues en punto 4.2.5.4 (figura 59) se mostró como compatible con la enzima libre, por lo que la pérdida de actividad para la enzima inmovilizada podría estar relacionada con algún tipo de efecto adverso del líquido iónico hacia el soporte.

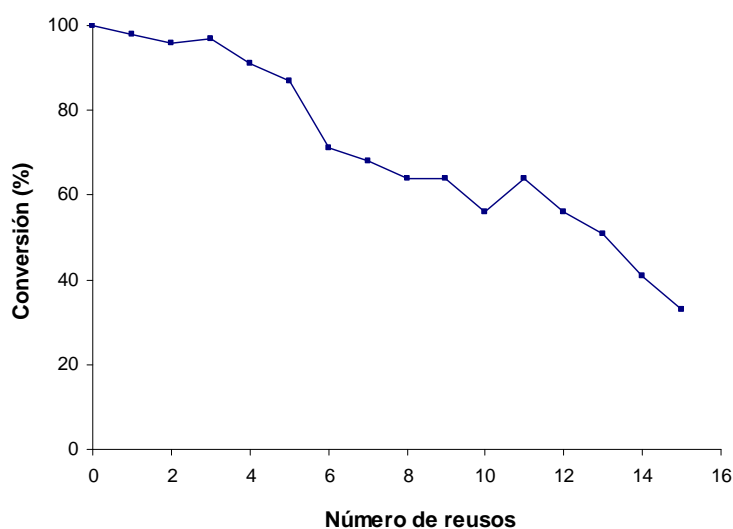


Figura 74. Estudio de reusos de la enzima GX-TTP0042 en presencia de 10% m/v de [CPMA][MeSO₄] a 60°C en la síntesis de Gal β (1 \rightarrow 4)GlcNAc.

La figura 74 muestra una desactivación que al reuso 5 comienza a descender hasta el 90%, al reuso 10 la conversión es de casi un 55% y al reuso 15 la conversión es de un 35%, siendo éste último dato superior a la conversión obtenida por la enzima en medio acuoso tamponado en el mismo reuso. En todo caso, las conversiones realizadas en presencia de líquido iónico tienen un equilibrio de reacción desplazado hacia la síntesis de Gal β (1 \rightarrow 4)GlcNAc con hasta un 82% mientras que las reacciones realizadas en buffer poseen un equilibrio que no favorece la síntesis de disacárido con rendimientos del 34%, por lo que, pese a la evidente inactivación sufrida por el catalizador en presencia de 10% m/v de [CPMA][MeSO₄], es posible concluir que dicho medio es más favorable para la síntesis del disacárido que el medio acuoso tamponado.

4.3.3. Inmovilización de TTP0042 en CLEA's

La enzima TTP0042 se inmovilizó en forma de CLEA's dada su preferencia por el aldehído como reactivo para interaccionar con los residuos de lisinas. Los resultados de la inmovilización son en general favorables, dado que permiten inmovilizar y conservar actividad enzimática en los agregados entrecruzados. Sin embargo el factor que determina la inmovilización es el proceso de entrecruzamiento. Se probaron cuatro condiciones iniciales de inmovilización, donde dos permitieron precipitar la enzima y una de ellas retener una actividad aceptablemente buena para realizar estudios posteriores.

Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 58. De ellos es posible suponer que la mejor inmovilización se obtiene cuando la enzima es precipitada en un 66% v/v de dimetoxietano (DME), el sulfato de amonio es un buen agente precipitante pero no permite obtener CLEA's con suficiente actividad enzimática.

Tabla 58. Rendimientos de la inmovilización de la enzima TTP0042 en la formación de CLEA's con distintos agentes precipitantes.

Agente Precipitante	% Inmovilización	Actividad Relativa (%)
DME (66 % v/v)	96	77
DME (33 % v/v)	-	-
PEI	-	-
(NH ₄) ₂ SO ₄	95	12

4.3.4. Síntesis de Gal β (1 \rightarrow 4)GlcNAc con TTP0042 inmovilizada sobre diferentes soportes

Se sintetizó Gal β (1 \rightarrow 4)GlcNAc en las condiciones óptimas de reacción de la enzima TTP0042 previamente determinadas utilizando la enzima libre e inmovilizada sobre las distintas estrategias evaluadas: soporte macroporoso (162R), glioxil agarosa y CLEA's. La reacción se realizó en tampón fosfato de sodio y a 60°C, este dato se muestra en la tabla 59.

Tabla 59. Síntesis de disacáridos con la enzima TTP0042 inmovilizada sobre distintas soportes.

Catalizador	Autocondensado Gal β [1 \rightarrow 3]Gal- β -pNP	Autocondensado Gal β [1 \rightarrow 6]Gal- β -pNP	Hidrólisis (galactosa)	Gal β [1 \rightarrow 4]Glc NAc	Conversión
Enzima libre	59	14	7	20	91%
Enzima 162R	59	2	--	39	99%
Enzima GX	37	14	15	34	99%
CLEA	64	16	4	16	75%

4.4. SÍNTESIS DE GLICOCONJUGADOS CON LIPASAS

Se estudió el uso de lipasas como catalizador para obtener glicoconjugados, en primera instancia se utilizó el enfoque de acilar azúcares con ésteres vinílicos de ácidos grasos. Las lipasas utilizadas han sido: CAL, CAL-B y ROL. Primeramente se caracterizaron las lipasas por su pureza, actividad hidrolítica y selectividad ante sustratos, luego se evaluaron como catalizadores de síntesis de glicoconjugados o desacetilación selectiva de azúcares y finalmente se inmovilizaron sobre soportes macroporosos para su uso como biocatalizadores.

4.4.1. Caracterización de las lipasas utilizadas

De las lipasas utilizadas, se realizó una caracterización general de las mismas, pues son obtenidas comercialmente como es el caso de CAL, CAL-B y *P. stutzeri*, o facilitadas por otros laboratorios como ROL. Sin embargo se determinó la pureza de las mismas, su riqueza proteica en los sólidos facilitados y su actividad hidrolítica.

4.4.1.1 Lipasas de *C. antarctica*

Las lipasas de *C. antarctica* fueron obtenidas de Sigma-Aldrich, su riqueza proteica se midió mediante el método Bradford, determinando así el contenido total de proteínas presentes en los sólidos comerciales.

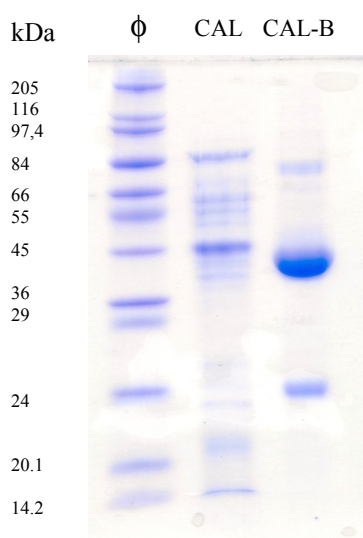


Figura 75. SDS-PAGE para las muestras comerciales de CAL y CAL-B utilizadas en este estudio. Los pocillos se cargaron con 7 µg de proteína cada uno.

Los resultados obtenidos muestran que las lipasas poseen menos de un 10% de proteínas, concretamente: 6,2% en CAL y 8,7% en CAL-B. Una vez determinada su riqueza proteica, se determinó la pureza mediante SDS-PAGE, (figura 75), como resultado se obtuvieron numerosas bandas en CAL y una pureza más pronunciada en CAL-B. En todo caso, las proteínas comerciales han mostrado una menor pureza respecto a las proteínas de producción y purificación propia como lo fue el caso de TTP0042.

La actividad lipásica de estas enzimas se midió contra tres tipos diferentes de sustratos, utilizando el método directo para medir la hidrólisis de los mismos a pH 7,0 y 37°C, no se utilizó el método indirecto debido a que la adición de carbonato de sodio genera un medio alcalino capaz de saponificar los sustratos. Los sustratos utilizados son *p*-nitrofenil ésteres de ácidos carboxílicos: *p*NFA, *p*NFB y *p*NFP, se disolvieron en 2-propanol (10 mM) dada su insolubilidad en agua y posteriormente se añadieron al medio de reacción, su concentración final en la cubeta fue de 1,0 mM. La liberación de *p*NF se midió contra una recta de calibrado realizada a pH 7,0 en las mismas condiciones de la hidrólisis. Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 60.

Tabla 60. Actividad lipásica y esterásica de las lipasas de *C. antarctica* utilizadas en este estudio. Las actividades se midieron a pH 7,0 en tampón fosfato de sodio 50 mM y una concentración final de 1,0 mM de sustrato utilizando el método directo a 37°C.

Enzima	Sustrato	Actividad (U/mg enzima)
CAL	<i>p</i> NF-Palmitato	47,3
CAL	<i>p</i> NF-Butirato	63,1
CAL	<i>p</i> NF-Acetato	2,97
CAL-B	<i>p</i> NF-Palmitato	14,9
CAL-B	<i>p</i> NF-Butirato	20,0
CAL-B	<i>p</i> NF-Acetato	10,3

En ambos casos, las lipasas utilizadas muestran una tendencia hidrolítica más favorable hacia la cadena de cuatro carbonos, mostrando 63,1 U.mg⁻¹ de actividad en el caso de la CAL y 20,0 U.mg⁻¹ cuando se utilizó la CAL-B. Esto muestra que la cadena más favorable en términos de hidrólisis es la del ácido butírico (C-4). El segundo grupo favorecido es la cadena del ácido palmítico (C-16) que se libera con mayor facilidad que el grupo acetato (C-2), por ello la tendencia hidrolítica encontrada con ambas enzimas fue la siguiente: butirato > palmitato > acetato. Sin embargo, es importante recordar que este

dato es una referencia de la capacidad de reconocimiento de la enzima, aunque no es del todo extrapolable a la actividad sintética de la enzima, pues la síntesis requiere las condiciones inversas de la hidrólisis para favorecer su tendencia en el equilibrio.

4.4.1.2 Lipasas de *R. oryzae*

La lipasa recombinante de *R. oryzae* expresada en *P. pastoris* fue facilitada por el grupo de investigación del Prof. Dr. Paco Valero de la Universidad Autónoma de Barcelona. Esta enzima, al igual que las lipasas de *C. antarctica* se caracterizó y además se realizó una comparación preliminar con la lipasa comercial de *R. oryzae* que distribuye Sigma-Aldrich, para comparar características generales de ambos preparados.

La riqueza proteica de la proteína recombinante en *P. pastoris* es de un 11% respecto al sólido facilitado mientras que la de Sigma-Aldrich es de 8%. Los geles de electroforesis de ambas proteínas se muestran en la figura 76. En ellos se parecían dos perfiles de elución muy distintos entre sí, con una banda predominante entre 45 y 36 kDa para la enzima comercial de Sigma-Aldrich, mientras que la banda principal de la enzima recombinante aparece en un peso molecular ligeramente menor, pero entre las mismas bandas del marcador de peso molecular.

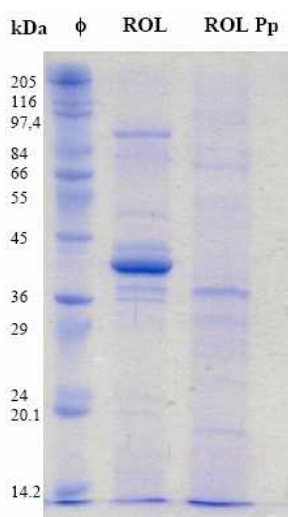


Figura 76. SDS-PAGE para las muestras de *R. oryzae*: ROL corresponde a la enzima comercial de Sigma-Aldrich y ROL Pp a la enzima recombinante en *P. pastoris* facilitada por el grupo del Prof. Ferrer. Los pocillos se cargaron con 7 µg de proteína cada uno.

Se cuantificó la actividad del enzima libre usando la misma metodología seguida con las lipasas de *C. antarctica*. Midiendo la producción de *p*-nitrofenol producido por hidrólisis de *p*-nitrofenil ésteres. Los resultados de este estudio se muestran en la tabla 61. En ella se aprecia que ambas enzimas poseen una marcada tendencia a hidrolizar ésteres de cadenas largas como el palmitato. Este dato constituye una diferencia importante entre la lipasa recombinante de ROL y las lipasas de *C. antarctica*, siendo que las primeras muestran una preferencia hidrolítica sobre cadenas largas como el palmitato mientras que las lipasas de *C. antarctica* muestran más afinidad hacia los esteres de butirato. Lo que sugiere que para efectos de síntesis de glicoconjugados ambas enzimas pueden ser utilizadas para acilar con distintas cadenas.

Tabla 61. Actividad hidrolítica de la enzimas enzimas de *R. oryzae*.

Enzima	Sustrato	Actividad (U/mg enzima)
ROL (comercial)	<i>p</i> NF-acetato	24,1
ROL (comercial)	<i>p</i> NF-butirato	30,3
ROL (comercial)	<i>p</i> NF-palmitato	116
ROL (recombinante)	<i>p</i> NF-acetato	4,2
ROL (recombinante)	<i>p</i> NF-butirato	10,3
ROL (recombinante)	<i>p</i> NF-palmitato	18,8

4.4.2. Síntesis de glicoconjugados utilizando lipasas libres

Se evaluó la síntesis de glicoconjugados utilizando enzimas libres de *C. antarctica* y *R. oryzae*. Se utilizaron distintas condiciones de reacción: disolventes, agentes acilantes, sustratos aceptores y tiempos de reacción. Como condiciones generales, las reacciones se efectuaron a 40°C en ausencia de agua, añadiendo de un 5%-10% de tamiz molecular anhidro a las muestras de reacción y su análisis se realizó cualitativamente mediante TLC con una mezcla de diclorometano: metanol (7:3), con un revelado mediante ácido fosfomolibdico. La cuantificación de las reacciones se realizó por HPLC-ELSD en las condiciones descritas en la literatura consultada.⁹⁷

4.4.2.1 Reacciones en tetrahidrofurano y 2-metiltetrahidrofurano:

Se utilizaron los disolventes THF y Me-THF como medios de reacción dado que su polaridad es compatible en parte con los sustratos y en parte con los productos. Se utilizó como aceptor *p*NF- β -Gal (0.10 mmol) y como donadores (0,50mmol): butirato de vinilo, laurato de vinilo y esterato de vinilo). Inicialmente se utilizó CAL-B como catalizador. Se tomaron alícuotas de 100 μ L a las 0 y 72 horas de reacción para analizar su composición por HPLC. Los resultados obtenidos en este primer ensayo de acilación se muestran en la tabla 62.

Tabla 62. Acilación de *p*NF- β -Gal en THF y Me-THF utilizando CAL-B como catalizador.

Ensayo	Disolvente	Aceptor	Resultado
1	THF	Butirato de vinilo	100% hidrólisis
2	THF	Laurato de vinilo	15% síntesis
3	THF	Esterato de vinilo	12% síntesis
4	Me-THF	Butirato de vinilo	100% hidrólisis
5	Me-THF	Laurato de vinilo	100% hidrólisis
6	Me-THF	Esterato de vinilo	100% hidrólisis

De la tabla 62 se puede apreciar que la enzima no muestra actividad sintética, sino que en casi todos los casos se registra hidrólisis, además, parece ser que el THF es un disolvente más afin a la enzima para catalizar este tipo de reacciones mientras que el Me-THF es menos aceptado. En todo caso, los rendimientos obtenidos se consideran poco exitosos.

Por ello las reacciones se repitieron con las enzimas CAL y ROL, usando una cadena más grande de ácido graso: el laurato de vinilo, debido a que el butirato de vinilo no pareció ser reconocido para la acilación sino para la hidrólisis del mismo. Y en la literatura este sustrato parece ser fácilmente reconocido por la lipasa.^{137, 242} Los resultados obtenidos en las nuevas reacciones se detallan en la tabla 63. En ella es posible apreciar que las enzimas utilizadas mantienen una nula actividad sintética, favoreciendo la hidrólisis del sustrato, dando lugar al consumo de los ésteres vinílicos y formando ácido láurico como producto de hidrólisis. La concentración de *p*NF- β -Gal permaneció invariable hasta el final de la reacción, lo que indica que la reacción de acilación nunca se concretó.

Tabla 63. Acilación de *p*NF- β -Gal con laurato de vinilo en distintas condiciones de reacción.

Ensayo	Enzima	Disolvente	Aceptor	Resultado
1	ROL	THF	Laurato de vinilo	100% hidrólisis
2	ROL	Me-THF	Laurato de vinilo	100% hidrólisis
3	CAL	THF	Laurato de vinilo	100% hidrólisis
4	CAL	Me-THF	Laurato de vinilo	100% hidrólisis

4.4.2.2. Reacciones en *Terc*-butanol y líquidos iónicos:

De acuerdo a la bibliografía el T-BuOH se postula como un disolvente compatible con las lipasas y los sustratos y en ciertos casos se acompaña de líquidos iónicos como cosolventes.^{97, 101} Por ello se decidió utilizar este disolvente y utilizar una relación donador: aceptor a 1:1 con un pequeño déficit de donador (95% de donador) para evitar posibles di-acilaciones. También se redujo el tiempo de reacción a 24h para evitar múltiples acilaciones. Los resultados de la reacción se describen en detalle en la tabla 64.

Tabla 64. Reacciones de acilación de *p*NF- β -gal con distintas enzimas y sustratos acilantes luego de 24 horas de reacción en *terc*-butanol como disolvente.

Enzima	Acilante	Hidrólisis (%)	Acilación (%)	Conversión (%)
CAL	V. butirato	100	0	100
CAL	V. laurato	48	0	48
CAL	V. esterato	96	0	96
CAL-B	V. butirato	100	0	100
CAL-B	V. laurato	70	0	70
CAL-B	V. esterato	93	0	93
ROL	V. butirato	100	0	100
ROL	V. laurato	32	19	51
ROL	V. esterato	80	20	100

De la tabla anterior, es posible observar que las reacciones ocurrieron con una marcada tendencia de hidrólisis para la enzima de *C. antarctica* y poca síntesis que solo se obtuvo con la lipasa de ROL. La baja tendencia sintética en presencia de T-BuOH ha sido reportada por otros autores para la acilación de sacarosa con laurato de etilo y butirato de etilo al utilizar T-BuOH y CAL inmovilizada sobre soportes acrílicos.¹⁰¹ Sin embargo,

este dato ha sido mejorado para la acilación de glucosa con CAL-B en presencia de líquidos iónicos.⁹⁷

Luego de los resultados obtenidos, se realizó una nueva aproximación, en condiciones más diluidas de sustratos disuelto en T-BuOH y un 10% de líquido iónico (sistema bifásico) utilizando el líquido [Bmim][PF₆] que ha sido utilizado anteriormente por otros autores con buenos resultados,^{97, 242} pese a su insolubilidad en el medio. En esta ocasión se utilizó otro aceptor: GlcNAc, con la finalidad de analizar si los bajos rendimientos obtenidos en las ocasiones anteriores se han debido a la naturaleza del primer aceptor (*p*NF-β-Gal), además se descartó el vinil butirato como donador ya que por los resultados anteriores se considera que la enzima reconoce este sustrato con una tendencia a la hidrólisis pero no a la síntesis.

Los resultados de la reacción efectuada aparecen mostrados en la tabla 65. En ellos se observó que pequeñas cantidades de GlcNAc fueron consumidas y en su lugar aparecieron nuevos compuestos en el cromatograma de HPLC que corresponden a productos de acilación. Sin embargo, los rendimientos en todo caso han sido sumamente bajos (máximo 10%) y por ello no se llegaron a purificar ni caracterizar.

Tabla 65. Reacciones de acilación de GlcNAc con distintas enzimas y sustratos acilantes luego de 24 horas de reacción en terc-butanol / [Bmim][PF₆] (10%) como medio de reacción.

Enzima	Acilante	Hidrólisis (%)	Acilación (%)	Conversión (%)
CAL	V. laurato	90	10	100
CAL	V. esterato	100	--	100
CAL-B	V. laurato	96	4	100
CAL-B	V. esterato	99	1	100
ROL	V. laurato	100	--	100
ROL	V. esterato	100	--	100

Pese a los bajos niveles de síntesis, resulta importante señalar que la lipasa de CAL y CAL-B reconocen a la cadena de ácido laurico como donador en la síntesis, tal y como lo reportan varias referencias consultadas,^{97, 137, 138, 242} sin embargo el aceptor usado en este caso, se diferencia de la literatura debido a su grupo 2-acetamido (*N*-acetil) y quizás esto signifique una dificultad añadida al sistema, en parte por que la solubilidad del sustrato

puede verse afecta y en parte por que existe la posibilidad de que la enzima no lo reconozca en el sitio activo con la facilidad que lo hace con la glucosa.

4.4.3. Síntesis de glicoconjugados utilizando lipasas inmovilizadas

Se evaluó la inmovilización de las lipasas previamente utilizadas sobre soportes macroporosos. Para ello se realizó en primera instancia un screening de todos los soportes disponibles y las enzimas de *C. antarctica*. Una vez seleccionados los mejores soportes se repitió la inmovilización con la enzima de *R. oryzae*.

4.4.3.1. Inmovilización de lipasas de *C. antarctica* sobre soportes macroporosos

Se inmovilizó la lipasa CAL sobre los polímeros macroporosos funcionalizados con grupos epóxidos disponibles. En total se realizaron 20 inmovilizaciones diferentes con una carga de 10 mg de proteína por cada gramo de soporte. Los resultados obtenidos (tabla 66) muestran que muchos soportes registraron una baja inmovilización, cercana al 50% de la carga enzimática añadida y tan solo tres de ellos: 83H, 107M y 122B permitieron alcanzar un 100% de inmovilización pero con actividades enzimáticas demasiado bajas ($\geq 38\%$) respecto a la enzima libre, lo que les convierte en soportes poco interesantes para inmovilizar la enzima. Por este motivo se introdujo un nuevo parámetro: la efectividad del proceso o rendimiento general de la inmovilización.

El rendimiento general del proceso es un parámetro introducido para comparar cuantitativamente los resultados de la inmovilización tomando en cuenta los dos factores fundamentales de esta: la cantidad de enzima anclada al soporte y la actividad enzimática retenida respecto a la enzima libre, una vez anclada al soporte. Este parámetro sería 100 cuando se ha inmovilizado toda la proteína en el soporte y la misma conserva toda su actividad original. La fórmula de cálculo de este parámetro se muestra en detalle en la ecuación 2.

$$R = \frac{I \cdot A}{100}$$

Ecuación 2. Rendimiento general de la inmovilización (efectividad del proceso), donde: I = porcentaje de inmovilización y A = Porcentaje de actividad de la enzima inmovilizada respecto a la enzima libre original.

Tabla 66. Inmovilización de CAL en polímeros macroporosos.

Polímero	% Inmovilización	U/gramo de soporte	U/mg proteína	% Actividad retenida	Efectividad del proceso ^a (%)
112I	70	14,1	25,1	53	37
103G	64	11,4	22,3	47	30
67B	61	6,3	13,0	27	15
133A	63	3,2	6,4	14	8,8
143E	44	18,7	53,1	112	49
159	55	3,8	8,7	18	9,9
163L	55	3,7	8,4	18	9,9
83H	100	2,8	3,5	7,4	7,4
107M	100	4,7	5,9	12	12
122B	100	14,4	17,9	38	38
146K	89	18,8	26,4	56	50
152A	52	8,4	20,3	43	22
153A	67	1,1	2,0	4,2	2,8
157I	54	2,8	6,4	14	7,6
162R	89	0,7	0,9	1,9	1,7
177A	45	2,7	0,75	1,6	0,7
178A	51	0	0	0	0
179B	42	7,3	2,17	4,6	1,9
180A	37	0	0	0	0
Eupergit					
Enzima					
Libre	--	--	47,3	100	--

^a Se determinó este parámetro siguiendo la ecuación 1.

Comparando los resultados a partir de la efectividad de la inmovilización se obtienen dos polímeros que destacan de los demás por su inmovilización: el 143E y 146K. En el caso del polímero 143E pese a presentar una baja inmovilización (44%) su actividad retenida es del 112% mostrando un posible fenómeno de hiperactivación de la lipasa como ha ocurrido en otros casos donde las lipasas inmovilizadas registran mayor actividad enzimática debido a una adecuada unión del soporte con la tapadera abierta de la lipasa.^{244, 302} Sin embargo la efectividad total del proceso de inmovilización es muy baja, con un rendimiento global del 49%. Un dato similar se obtiene al calcular la efectividad del proceso con el polímero 146 K donde la inmovilización total es de 89% y la actividad retenida es del 56%, dando un 50% de rendimiento general. En este caso el valor obtenido es relativamente alto debido a que existe un mayor anclaje de la enzima al soporte.

Pese a que los resultados obtenidos han sido moderados en cuanto a la inmovilización efectiva del proceso, queda claramente evidenciado que son mucho más compatibles con lipasas que con glicosidas, debido a los bajos resultados obtenidos con la enzima TTP0042. Esta mejora de los resultados de inmovilización en lipasas puede estar relacionada con la naturaleza mas hidrofóbica que poseen los polímeros macroporosos utilizados respecto a las glioxil agarosas que son más hidrofílicas y que favorecieron notoriamente la inmovilización de la β -galactosidasa de *T. thermophilus*. Así pues, los polímeros hidrofóbicos parecen ser mejores soportes para lipasas y los polímeros hidrofílicos más afines para la inmovilización de glicosidasas.

El screening de inmovilización se repitió con la enzima CAL-B, permitiendo observar mejores resultados generales de inmovilización que los obtenidos con CAL. Los resultados de este trabajo aparecen en la tabla 67.

Tabla 67. Inmovilización de CAL-B en polímeros macroporosos.

Polímero	% Inmovilización	U/gramo de soporte	U/mg proteína	% Actividad retenida	Efectividad del proceso (%)
112I	70	7,4	13,2	89	62
103G	64	1,6	3,05	20	13
67B	61	0	0	0	0
116A	92	7,2	9,8	66	61
133A	63	0	0	0	0
143E	44	0	0	0	0
159 O	55	2,1	4,84	32	18
163L	55	20,5	14,5	100	172
83H	100	0	0	0	0
107M	100	0	0	0	0
122B	100	0	0	0	0
146K	82	2.98	0,75	5,0	4,1
152A	52	1,1	0,59	4,0	2,1
153A	67	6,23	1,64	11	7,4
157I	54	5,88	2,8	19	10
162R	89	10,5	14,7	99	88
Eupergit					
Enzima libre	--	--	14,9	100	--

En primer lugar muchos polímeros superaron el 70% de inmovilización de la enzima: 112I, 116A, 83H, 107M, 122B, 146K y 162R. Por otra parte varios polímeros conservaron más de un 66% de actividad enzimática: 112I, 116A, 162R y 163L. El balance general del proceso muestra que éstos últimos cuatro polímeros superan el 60% de inmovilización efectiva, dando claramente, mejores resultados que los obtenidos con CAL.

Este screening mostró que la lipasa CAL-B muestra mayor afinidad que la CAL en cuanto a la inmovilización sobre los mismos soportes y en las mismas condiciones. Mostrando que la lipasa B es mucho más afín que el conglomerado de lipasas de menor pureza presentes en la CAL. También se confirmó la tendencia de que los polímeros utilizados al ser en general más hidrofóbicos que las glioxil agarosas muestran una mayor afinidad para inmovilizar lipasas y se constituyen en una alternativa válida para inmovilizar enzimas hidrofóbicas como las lipasas.

4.3.3.2. Reacciones de acilación con lipasas inmovilizadas

Tomando en cuenta que muchas de las reacciones de acilación reportadas en la literatura están referidas a CAL-B inmovilizada sobre resinas acrílicas (por ejemplo nozyme 435 y chirazyme) y utilizando el ácido láurico como cadena acilante,^{137, 303} se decidió realizar la acilación del GlcNAc considerando estos factores. El polímero a utilizar fue el 146K dado que posee: naturaleza acrílica y presenta una aceptable retención de actividad de la enzima inmovilizada. Se realizó una reacción de acilación de GlcNAc con laurato de vinilo como acilante en T-BuOH con distintas proporciones de donador:aceptor, en virtud de las distintas referencias consultadas.^{97, 101}

Tabla 68. Acilación de GlcNAc con laurato de vinilo utilizando CAL-B inmovilizada.

Relación molar aceptor:donador	Hidrólisis (%)	Acilación (%)	Conversión ^a (%)
1:2	100	--	100
1:5	100	--	100
1:15	100	--	100
1:30	100	--	100

^a La conversión está calculada respecto al consumo de laurato de vinilo, pese a que es un reactivo en exceso. Puesto que el GlcNAc no se consumió.

Los resultados obtenidos en la tabla 68 muestran una vez más que la lipasa de CAL-B no presenta tendencia hacia la síntesis de glicoconjugados, sino que es altamente hidrolítica. El mismo resultado se ha obtenido en reiteradas ocasiones con las lipasas utilizadas, pese a que en la literatura^{97, 101} se menciona que la lipasa CAL-B es capaz de acilar la glucosa, esto lleva a pensar que la naturaleza del sustrato afecta visiblemente los resultados de la reacción. El uso de sustratos con base de galactosa (*p*NF-β-Gal) o una glucosa *N*-sustituida (GlcNAc) podría ser la causa de los resultados obtenidos en reiteradas ocasiones pese a que se han variado las condiciones de reacción: proporción donador:aceptor, tipos de aceptor, disolvente, naturaleza de la enzima (libre e inmovilizada) y tipos de enzima (CAL, CAL-B y ROL). Por lo anterior, los reiterados resultados negativos pueden estar relacionados con un problema de reconocimiento de los sustratos utilizados en el sitio activo de la enzima, dando como resultado la reacción más básica de la lipasa frente a los ésteres de ácidos grasos: la hidrólisis, que predominó en todos los ensayos analizados.

V. CONCLUSIONES

5. CONCLUSIONES

Una vez presentados los resultados obtenidos y considerando los objetivos propuestos en la realización de éste trabajo, se pueden plantear las siguientes conclusiones:

1- La β -galactosidasa contenida en el preparado comercial de Biolacta N° 5 es una mezcla de bajo contenido proteico en masa (~11%), cuya regioselectividad en reacciones de transglicosidación con determinados disolventes (DMA1, G1, GC7, GC8, GC11) cambia para favorecer la producción de Gal- β [1→6]-GlcNAc en lugar de la habitual Gal- β [1→4]-GlcNAc.

2- La eliminación de componentes no proteicos del preparado de Biolacta N°5 puede alcanzarse fácilmente mediante la precipitación con sulfato de amonio, pero no es recomendable liofilizar el producto obtenido, ya que al parecer el proceso de liofilizado afecta la estructura terciaria de las proteínas de éste extracto.

3- La mayor parte de las proteínas presentes en el preparado de Biolacta N° 5 forman agregados multiméricos de alto peso molecular según se apreció en la electroforesis no desnaturalizante, mientras que parte de los monómeros y/o sub unidades de tales agregados se pueden apreciar cuando éste proceso se realiza en condiciones desnaturalizantes.

4- Existen fuertes evidencias tanto en la literatura consultada como en los resultados obtenidos, que asocian la identidad del preparado comercial de Biolacta con la β -galactosidasa de *Streptococcus pneumoniae* SP9-BS68 más que con la β -galactosidasa de *Bacillus circulans* ATTC 31382.

5- El uso de líquidos iónicos puede modificar los rendimientos de Gal- β [1→4]-GlcNAc obtenidos con la β -galactosidasa de Biolacta N° 5 llegando en algunos casos a mejorar de forma moderada ([Toma][Ntf₂]) los resultados obtenidos en medio acuoso tamponado.

6- Los extractos celulares de HB27 inducidos presentan una clara preferencia hacia enlaces β -fucosa respecto a las uniones β -galactosa. A juzgar por los comportamientos de éstos extractos y los obtenidos con T42kat, la enzima de mayor relevancia en su actividad biocatalítica durante las reacciones de transglicosidación es la TTP0042, siendo ésta alrededor de 160 veces superior en actividad específica respecto a la TTP0222.

7- Se logró determinar que las condiciones óptimas de trabajo para los extractos celulares de HB27 (inducido con celobiosa) requieren de tampón fosfato sodico pH 5,50 25 mM bajo las cuales presenta un comportamiento de tipo Michaelis-Menten, mientras que con la enzima TTP0042 purificada el valor de pH es mucho más amplio por lo que se ha seleccionado como óptimo el pH 6,00 y una concentración de tampón de 50 mM.

8- La actividad sintética en reacciones de transglicosidación empleando biocatalizadores derivados de HB27 (extractos celulares y enzimas recombinantes) y HB27kat, presenta una fuerte tendencia a la autocondensación del sustrato donador (Gal- β [1 \rightarrow 3]-Gal- β -pNF y Gal- β [1 \rightarrow 6]-Gal- β -pNF) en una reacción de poca utilidad en la síntesis de glicoconjugados de interés terapéutico.

9- El uso de líquidos iónicos en reacciones de transglicosidación utilizando extractos de HB27 (inducido con celobiosa) puede aumentar los porcentajes de disacárido como ocurrió con los líquidos [Bmim][PF₆] y [CPMA][CH₃SO₄]. Esta tendencia fue más notoria al utilizar la enzima TTP0042 en presencia de [Bmim][PF₆], [Omim][PF₆], [Toma][Ntf₂] y [Omim][Ntf₂], obteniendo una favorable producción de disacárido β [1 \rightarrow 4] y pocos resultados (incluso nulos) de autocondensación del donador.

10- La enzima TTP0042 expresada en HB27Nar presenta una mayor actividad específica (248 U/mg) respecto a la misma enzima expresada en *E. coli* (165 U/mg) debido al parecer a que el hospedero termófilo puede favorecer un plegamiento más adecuado de la enzima que un hospedero mesófilo. Sin embargo los rendimientos en cuanto a cantidades de proteína obtenida son mucho mejores cuando la expresión se realiza en *E. coli*. La reactividad de ésta enzima en reacciones de transglicosidación es la misma independientemente del organismo en el cual se expresa.

11- De los diferentes aceptores utilizados en las reacciones de transglicosidación con biocatalizadores de origen termófilo, el disacárido de mayor interés por su valor farmacéutico es Gal- β (1 \rightarrow 4)-GlcNAc. Este sustrato se puede obtener con mejores rendimientos modificando las condiciones de reacción hacia medios más concentrados en donador y aceptor con cantidades moderadas de enzima.

12- Se encontró que la enzima TTP0042 modifica su regioselectividad con distintos disolventes verdes como: derivados cíclicos del glicerol (G1 y G2), derivados de la dimetilamida (DMA1, DMA2 y DMA3) y derivados de cadena abierta del glicerol (GC4, GC8, GC9, GC10 y GC12). Sin embargo, en presencia de otros disolventes de naturaleza similar: G3, GC5, GC6, GC7 y GC11, la enzima se mostró completamente inactiva.

13- La presencia de líquidos iónicos en el medio de reacción, genera una interacción inespecífica entre la enzima TTP0042 y los LIs, caracterizada por una cinética de asociación y disociación muy rápida, con una constante de equilibrio (K_D) en el rango milimolar. Esta débil interacción genera cambios conformacionales en la estructura secundaria y terciaria de la enzima, aumentando su flexibilidad y es probablemente la causante de la mejora sintética de la enzima hacia la síntesis de Gal- β (1 \rightarrow 4)-GlcNAc cuando la reacción ocurre en presencia de LIs en lugar del producto mayoritario cuando la reacción se lleva a cabo en tampón: Gal- β (1 \rightarrow 3)-Gal- β -pNF.

14- La enzima TTP0222 es una enzima poco documentada de baja actividad específica y cuya reactividad en la reacción de transglicosidación estudiada es bastante similar a la enzima TTP0042 his₆tag si se compara bajo las mismas condiciones de reacción. Por tal motivo la enzima TTP0222 his₆tag es poco atractiva como biocatalizador para síntesis de disacáridos.

15- La inmovilización de TTP0042 sobre soportes macroporosos funcionalizados con epóxidos mostró bajos resultados debido a dos probables causas: la primera de ella la inespecificidad química de los epóxidos que pueden reaccionar con la cisteína 167 de TTP0042 produciendo una obstaculización del centro activo de la enzima y disminuyendo notablemente su actividad hidrolítica, la segunda es la naturaleza poco

hidrofílica de los soportes utilizados que puede afectar el entorno químico de una enzima altamente hidrofílica.

16- La cisteína 167 de la enzima TTP0042 posee un papel de gran importancia en la actividad de la enzima y en la naturaleza es sustituida por valina en otras enzimas homologas, al realizar dicho cambio sobre TTP0042 se obtiene una disminución de la actividad hasta un 25% respecto de la enzima original. El cambio de la cisteína 167 por una serina trae como consecuencia la inactividad de la enzima, mostrando una inequivalencia química de este aminoácido en la funcionalidad de la enzima.

17- El uso de inhibidores competitivos durante la inmovilización de TTP0042 con soportes macroporosos protege la cisteína 167 de la unión covalente a los epóxidos y esto conlleva a un aumento de cinco veces en los rendimientos de actividad enzimática en la enzima inmovilizada.

18- La glioxil agarosa es un soporte funcionalizado con aldehídos que permite una mayor selectividad química hacia las lisinas de las enzimas. En el caso de la enzima TTP0042 este tipo de soportes permite una mayor retención de la actividad inicial de la enzima debido a la presencia de lisinas a una apropiada distancia y ubicación respecto al centro activo.

19- De los distintos tipos de agarosas utilizadas en este estudio, solo la glioxil agarosa tradicional aporta resultados importantes en la inmovilización de TTP0042. Los otros tipos de soportes orientan la enzima en direcciones donde la presencia de lisinas no parece ser importante, alcanzando bajos niveles de inmovilización o evitan un acercamiento adecuado de la enzima al soporte produciendo bajos niveles de actividad en el derivado inmovilizado.

20- La inmovilización de la enzima TTP0042 sobre glioxil agarosa aporta una serie de beneficios sobre su uso: mayor estabilidad térmica a 70°C, 80°C y 90°C, reusabilidad hasta en 13 veces en tampón y compatibilidad con líquidos iónicos manteniendo las mismas propiedades sintéticas de la enzima libre en presencia de dichos cosolventes.

21- La temperatura óptima de síntesis de LAcNAc catalizada por la enzima TTP0042 es de 60°C tanto para la enzima libre como inmovilizada. A bajas temperaturas se obtienen mayores niveles de hidrólisis, mientras que a altas temperaturas se favorece la reacción de autocondensación. La enzima libre muestra mayor tendencia a la autocondensación del donador mientras que la enzima inmovilizada favorece ligeramente la hidrólisis.

22- Las lipasas pueden acilar azúcares en condiciones óptimas de reacción, sin embargo, existen numerosos parámetros que pueden afectar los rendimientos: tiempo de reacción, disolvente, solubilidad de sustratos, actividad de la enzima y relación molar de aceptor:donador, entre otros.

23- El uso lipasas para acilar los sustratos *p*NF- β -Gal y GlcNAc no ofreció resultados importantes en la síntesis, en todos los casos estudiados se obtuvieron altos niveles de hidrólisis del éster vinílico con bajos o nulos rendimientos de glicoconjugados. Este resultado podría ser consecuencia de una falta de reconocimiento del sustrato en el centro activo de la enzima, favoreciendo la reacción básica de las lipasas: la hidrólisis.

VI. REFERENCIAS

6. REFERENCIAS

1. Van den Akker, F., Steensma, Elles., Hol, Wim., Tumor marker disaccharide D-Gal- β 1,3-GalNac complexed to heat-labile enterotoxin from *Escherichia coli*. *Prot. Sci.* **1996**, 5, 1184-1188.
2. Springer, G. F., T and Tn, general carcinoma autoantigens. *Science* **1984**, 224, 1198-1206.
3. Holeman, A.; Seeberger, P. H., Carbohydrate diversity: synthesis of glycoconjugates and complex carbohydrates. *Curr. Opin. Biotechnol.* **2004**, 15, (6), 615-622.
4. Sheldon, R. A., Arends, I., Hanefeld, U., *Green Chemistry and Catalysis*. Wiley-VCH: Weinheim, 2007.
5. Anastas, P. T. K., Mary M., Origins, Current Status, and Future Challenges of Green Chemistry. *Accounts of Chemical Research* **2002**, 35, (9), 686-694.
6. Anastas, P. T. W., J. C., *Green Chemistry: Theory and Practice*. New York, 1998.
7. R. A. Sheldon, Chimie/Chemistry. *C.R. Acad. Sci.* **2000**, 3, 541-551.
8. Kaupp, G., Solvent-free Organic Synthesis. By Koichi Tanaka. *Angewandte Chemie International Edition* **2003**, 42, (40), 4851-4852.
9. Hernaiz, M. J.; Alcántara, A. R.; García, J. I.; Sinisterra, J. V., Applied biotransformations in green solvents. *Chem. Eur. J.* **2010**, 16, 9422-9437.
10. Jessop Philip, G.; Trakhtenberg, S.; Warner, J., The Twelve Principles of Green Chemistry. In *Innovations in Industrial and Engineering Chemistry*, American Chemical Society: Washington, DC, 2008; pp 401-436.
11. Ball, P., *H2O: A Biography of Water*. Phoenix Press: London, 2000.
12. Capello, C.; Fischer, U.; Hungerbuhler, K., What is a green solvent? A comprehensive framework for the environmental assessment of solvents. *Green Chem.* **2007**, 9, (9), 927-934.
13. Pérez, M. Síntesis enzimática de disacáridos. Estudio del efecto del aceptor y la presencia de disolventes verdes. Universidad Complutense de Madrid., Madrid, 2009.
14. Solvsafe www.solvsafe.org. www.solvsafe.org (24 abril, 2010),
15. da Silva, G. P.; Mack, M.; Contiero, J., Glycerol: A promising and abundant carbon source for industrial microbiology. *Biotechnology Advances* 27, (1), 30-39.
16. Dasari, M. A., P.P. Kiatsimkul, W.R. Sutterlin, G.J. Suppes, Low-pressure hydrogenolysis of glycerol to propylene glycol. *Applied Catalysis a-General* **2005**, 281, (1-2), 225-231.
17. Wolfson, A.; Dlugy, C.; Shotland, Y., Glycerol as a green solvent for high product yields and selectivities. *Environ. Chem. Lett.* **2007**, 5, (2), 67-71.
18. García, J. I.; García-Marín, H.; Mayoral, J. A.; Pérez, P., Green solvents from glycerol. Synthesis and physico-chemical properties of alkyl glycerol ethers. *Green Chem.* **2010**, 12, 426-434.
19. De Simone, J. M., Practical Approaches to Green Solvents. *Science* **2002**, 297, (5582), 799-803.
20. DeSimone, J. M., Practical approaches to green solvents. *Science* **2002**, 297, (5582), 799-803.
21. Mori, T.; Li, M.; Kobayashi, A.; Okahata, Y., Reversible control of enzymatic transglycosylations in supercritical fluoroform using a lipid-coated β -D-galactosidase. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, 124, (7), 1188-1189.

22. Horváth, I. T., *Multiphase Homogeneous Catalysis*. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co KGaA: Weinheim Germany, 2005.
23. Galinski, M.; Lewandowski, A.; Stepniak, I., Ionic liquids as electrolytes. *Electrochim. Acta* **2006**, 51, (26), 5567-5580.
24. Kosmulski, M.; Gustafsson, J.; Rosenholm, J. B., Thermal stability of low temperature ionic liquids revisited. *Thermochim. Acta* **2004**, 412, (1&2), 47-53.
25. Dzyuba, S. V.; Bartsch, R. A., Expanding the polarity range of ionic liquids. *Tetrahedron Lett.* **2002**, 43, (26), 4657-4659.
26. Chiappe, C.; Pieraccini, D., Ionic liquids: solvent properties and organic reactivity. *J. Phys. Org. Chem.* **2005**, 18, (4), 275-297.
27. Earle, M. J.; Esperanca, J. M. S. S.; Gilea, M. A.; Canongia Lopes, J. N.; Rebelo, L. P. N.; Magee, J. W.; Seddon, K. R.; Widegren, J. A., The distillation and volatility of ionic liquids. *Nature* **2006**, 439, (7078), 831-834.
28. Fox, D. M.; Awad, W. H.; Gilman, J. W.; Maupin, P. H.; De Long, H. C.; Trulove, P. C., Flammability, thermal stability, and phase change characteristics of several trialkylimidazolium salts. *Green Chem.* **2003**, 5, (6).
29. Tsuzuki, S.; Tokuda, H.; Hayamizu, K.; Watanabe, M., Magnitude and directionality of interaction in ion pairs of ionic liquids: relationship with ionic conductivity. *The Journal of Physical Chemistry B* **2005**, 109, (34), 16474-16481.
30. Wasserscheid, P.; Keim, W., Ionic Liquids—New “Solutions” for Transition Metal Catalysis. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2000**, 39, (21), 3772-3789.
31. Hagiwara, R.; Ito, Y., Room temperature ionic liquids of alkyylimidazolium cations and fluoroanions. *J. Fluorine Chem.* **2000**, 105, (2), 221-227.
32. Welton, T., Ionic liquids in catalysis. *Coordination Chemistry Reviews* **2004**, 248, (21-24), 2459-2477.
33. Dupont, J. S. P. A. Z., Physico-chemical processes in imidazolium ionic liquids. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2006**, 8, 2441-2452.
34. Poole, C. F., Chromatographic and spectroscopic methods for the determination of solvent properties of room temperature ionic liquids. *Journal of Chromatography A* **2004**, 1037, (1-2), 49-82.
35. Wasserscheid, P., Welton, T., Eds., *Ionic Liquids in Synthesis*; Weinheim, Germany, 2003.
36. Liu, Q.; Janssen, M.H.A.; Rantwijk, F.V.; Sheldon, R.A., Room-temperature ionic liquids that dissolve carbohydrates in high concentrations *Green Chem.* **2005**, 7, 39-42.
37. Sheldon, R., Catalytic reactions in ionic liquids. *Chem. Commun.* **2001**, 2399-2407.
38. Gathergood, N.; Garcia, M.T.; Scammells, P.J., Biodegradable ionic liquids. Part I. Concept, preliminary targets and evaluation. **2004**, 6, 166-175.
39. Earle Martyn, J.; Seddon Kenneth, R., Ionic Liquids: Green Solvents for the Future. In *Clean Solvents*, American Chemical Society: Washington, DC, 2002; pp 10-25.
40. Madeira Lau, R.; Van Rantwijk, F.; Seddon, K. R.; Sheldon, R. A., Lipase-Catalyzed Reactions in Ionic Liquids. *Organic Letters* **2000**, 2, (26), 4189-4191.
41. Park, S.; Kazlauskas, R. J., Biocatalysis in ionic liquids - advantages beyond green technology. *Current Opinion in Biotechnology* **2003**, 14, (4), 432-437.
42. García, M. T., Gathergood, N., Scammells, P.J., Biodegradable ionic liquids. Part II. Effect of the anion and toxicology. *Green Chem.* **2005**, 7, 9-14.
43. Jastorff, B.; Störmann, R.; Ranke, J.; Mölter, K.; Stock, F.; Oberheitmann, B.; Hoffmann, W.; Hoffmann, J.; Nüchter, M.; Ondruschka, B.; Filser, J., How hazardous

are ionic liquids? Structure–activity relationships and biological testing as important elements for sustainability evaluation. *Green Chem.* **2003**, 5, 136-142.

44. Weijers, C. A. G. M.; Franssen, M. C. R.; Visser, G. M., Glycosyltransferase-catalyzed synthesis of bioactive oligosaccharides. *Biotechnol. Adv.* **2008**, 26, (5), 436-456.

45. Paulsen, H., Advances in Selective Chemical Syntheses of Complex Oligosaccharides. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1982**, 21, (3), 155-173.

46. Schimdt, R. R., Michel., Einfache synthese von α - und β -O-glycosylimidaten. Herstellung von glycosiden und disacchariden. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1980**, 92, 763-765.

47. Schimdt, R. R., Michel., Divinylglycole zur synthese von desoxyhexosen-synthese der D-bzw. L-Chalcose. *Angew. Chem., Int. Ed.* **1986**, 98, 213-236.

48. Tietze, L. F., Fischer, R., Guder., Stereoselective synthesis of protected 1-O-trimethylsilyl- α -D-glucopyranoside. *J.Synthesis.* **1982**, 946.

49. Alcalde, M.; Ferrer, M.; Plou, F. J.; Ballesteros, A., Environmental biocatalysis: from remediation with enzymes to novel green processes. *Trends Biotechnol.* **2006**, 24, 281-287.

50. Sheldon, R. A.; van Rantwijk, F., Biocatalysis for Sustainable Organic Synthesis. *Aust. J. Chem.* **2004**, 57, 281-289.

51. Perugino, G.; Trincone, A.; Rossi, M.; Moracci, M., Oligosaccharide synthesis by glycosynthases. *Trends in Biotechnology* **2004**, 22, (1), 31-37.

52. Withers, S. G.; Aebersold, R., Approaches to labeling and identification of active site residues in glycosidases. *Protein Sci* **1995**, 4, (3), 361-72.

53. Moracci, M., Trincone, A., Rossi, M., Glycosynthases: new enzymes for oligosaccharide synthesis. *J. Mol. Cat. B: Enz.* **2001**, 11, 155-163.

54. Drone, J.; Feng, H. Y.; Tellier, C.; Hoffmann, L.; Tran, V.; Rabiller, C.; Dion, M., *Thermus thermophilus* glycosynthases for the efficient synthesis of galactosyl and glucosyl β -(1 \rightarrow 3)-glycosides. *Eur. J. Org. Chem.* **2005**, (10), 1977-1983.

55. Ito, Y.; Sasaki, T., Cloning and Characterization of the Gene Encoding a Novel β -Galactosidase from *Bacillus circulans*. *Bios. Biotech. Biochem.* **1997**, 61, (8), 1270-1276.

56. Yanahira, S.; Kobayashi, T.; Suguri, T.; Nakakoshi, M.; Miura, S.; Ishikawa, H.; Nakajima, I., Formation of Oligosaccharides from Lactose by *Bacillus circulans* β -Galactosidase. *Bios. Biotech. Biochem.* **1995**, 59, (6), 1021-1026.

57. Usui, T.; Morimoto, S.; Hayakawa, Y.; Kawaguchi, M.; Murata, T.; Matahira, Y.; Nishida, Y., Regioselectivity of β -D-galactosyl-disaccharide formation using the β -D-galactosidase from *Bacillus circulans*. *Carbohydr. Res.* **1996**, 285, 29-39.

58. Zeng, X. X.; Yoshino, R.; Murata, T.; Ajisaka, K.; Usui, T., Regioselective synthesis of *p*-nitrophenyl glycosides of β -D-galactopyranosyl-disaccharides by transglycosylation with β -D-galactosidases. *Carbohydr. Res.* **2000**, 325, (2), 120-131.

59. Fujimoto, H.; Miyasato, M.; Ito, Y.; Sasaki, T.; Ajisaka, K., Purification and properties of recombinant β -galactosidase from *Bacillus circulans*. *Glycoconj. J.* **1998**, 15, (2), 155-160.

60. Vetere, A.; Paoletti, S., High-yield synthesis of *N*-acetylactosamine by regioselective transglycosylation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1996**, 219, (1), 6-13.

61. Mozaffar, Z., Nakanishi, Kazuhiro. Matsuno, Ryuchi., Kamikubo, Tadashi., Purification and properties of β -galactosidases from *Bacillus circulans*. *Agric. Biol. Chem.* **1984**, 48, (12), 3053-3061.

62. Vetere, A.; Paoletti, S., Separation and characterization of three β -galactosidases from *Bacillus circulans*. *Biochim. Biophys. Acta - General Subjects* **1998**, 1380, (2), 223-231.

63. Rothschild, L. J.; Mancinelli, R. L., Life in extreme environments. *Nature* **2001**, 409, (6823), 1092-1101.
64. Li, W. F.; Zhou, X. X.; Lu, P., Structural features of thermozymes. *Biotechnology Advances* **2005**, 23, (4), 271-281.
65. van den Burg, B., Extremophiles as a source for novel enzymes. *curr. Opin. Microbiol.* **2003**, 6, (3), 213-218.
66. Paiardini, A.; Gianese, G.; Bossa, F.; Pascarella, S., Structural plasticity of thermophilic serine hydroxymethyltransferases. Extensive comparative study of an enzyme family with a focus on the structural features involved in thermostabilization. *Proteins* **2002**, 50, 122-134.
67. Brock, T. D.; Freeze, H., *Thermus aquaticus* gen. n. and sp. N., a non sporulating extreme thermophile. *J. Bacteriol.* **1969**, 98, ((1)), 289-297.
68. Yokoyama, A.; Shizuri, Y.; Hoshino, T.; Sandmann, G., Thermocryptoxanthins: novel intermediates in the carotenoid biosynthetic pathway of *Thermus thermophilus*. *Arch. Microbiol.* **1996**, 165, 342-345.
69. Cava, F.; Hidalgo, A.; Berenguer, J., *Thermus thermophilus*; as biological model. *Extremophiles* **2009**, 13, (2), 213-231.
70. Ferreras, E. Expresión y estudio de enzimas termoestables de interés biotecnológico. Madrid, 2011. .
71. Takase, M.; Horikoshi, K., A thermostable β -glucosidase isolated from a bacterial species of the genus *Thermus*. *Appl. Microbiol. Biotech.* **1988**, 29, (1), 55-60.
72. Dion, M.; Fourage, L.; Hallet, J.-N.; Colas, B., Cloning and expression of a β -glycosidase gene from *Thermus thermophilus*. Sequence and biochemical characterization of the encoded enzyme. *Glycoconj. J.* **1999**, 16, (1), 27-37.
73. Henne, A.; Bruggemann, H.; Raasch, C.; Wiezer, A.; Hartsch, T.; Liesegang, H.; Johann, A.; Lienard, T.; Gohl, O.; Martinez-Arias, R.; Jacobi, C.; Starkuviene, V.; Schlenczeck, S.; Dencker, S.; Huber, R.; Klenk, H.-P.; Kramer, W.; Merkl, R.; Gottschalk, G.; Fritz, H.-J., The genome sequence of the extreme thermophile *Thermus thermophilus*. *Nat Biotech* **2004**, 22, (5), 547-553.
74. Fourage, L.; Dion, M.; Colas, B., Kinetic study of a thermostable β -glycosidase of *Thermus thermophilus*. Effects of temperature and glucose on hydrolysis and transglycosylation reactions. *Glycoconj. J.* **2000**, 17, (6), 377-383.
75. Kang, S. K.; Cho, K. K.; Ahn, J. K.; Bok, J. D.; Kang, S. H.; Woo, J. H.; Lee, H. G.; You, S. K.; Choi, Y. J., Three forms of thermostable lactose-hydrolase from *Thermus* sp. IB-21: cloning, expression, and enzyme characterization. *J. Biotechnol.* **2005**, 116, (4), 337-346.
76. Xiangyuan, H.; Shuzheng, Z.; Shoujun, Y., Cloning and expression of thermostable β -glycosidase gene from *Thermus nonproteolyticus* HG102 and characterization of recombinant enzyme. *Appl Biochem Biotechnol* **2001**, 94, (3), 243-55.
77. Gu, N.-Y.; Kim, J.-L.; Kim, H.-J.; You, D.-J.; Kim, H.-W.; Jeon, S.-J., Gene cloning and enzymatic properties of hyperthermostable β -glycosidase from *Thermus thermophilus* HJ6. *J. Biosci. Bioeng.* **2009**, 107, (1), 21-26.
78. Kang, S. K.; Cho, K. K.; Ahn, J. K.; Kang, S. H.; Lee, S. H.; Lee, H. G.; Choi, Y. J., Cloning, expression, and enzyme characterization of thermostable β -glycosidase from *Thermus flavus* AT-62. *Enzym. Microbiol. Tech.* **2005**, 37, (6), 655-662.
79. Han, K. W.; Yoo, J.; Oh, E. J.; Choi, J. J.; Kim, H. K.; Kwon, S. T., Cloning, analysis and expression of the gene for β -glycosidase of *Thermus caldophilus* GK24 and properties of the enzyme. *Biotechnology Letters* **2001**, 23, (5), 379-384.
80. Ohtsu, N.; Motoshima, H.; Goto, K.; Tsukasaki, F. & Matsuzawa, H., Thermostable β -Galactosidase from an Extreme Thermophile, *Thermus* sp. A4: Enzyme

- Purification and Characterization, and Gene Cloning and Sequencing. *Bios. Biotech. Biochem.* **1998**, 62, 1539-1545.
81. Koyama, Y.; Okamoto, S.; Furukawa, K., Cloning of α -galactosidase and β -galactosidase genes from an extreme thermophile, *Thermus* strain T2 and their expression in *Thermus thermophilus* HB27. *Appl. Environ. Microbiol.* **1990**, 56, (7), 2251-2254.
82. Pessela, B. C. C.; Vian, A.; Mateo, C.; Fernandez-Lafuente, R.; Garcia, J. L.; Guisan, J. M.; Carrascosa, A. V., Overproduction of *Thermus* sp. Strain T2 β -Galactosidase in *Escherichia coli* and Preparation by Using Tailor-Made Metal Chelate Supports. *Appl. Environ. Microbiol.* **2003**, 69, (4), 1967-1972.
83. Chiffolleau-Giraud, V.; Spangenberg, P.; Dion, M.; Rabiller, C., Transferase activity of a β -glycosidase from *Thermus thermophilus*: Specificities and limits - Application to the synthesis of β [1 \rightarrow 3]-disaccharides. *Eur. J. Org. Chem.* **1999**, (4), 757-763.
84. Fourage, L.; Colas, B., Synthesis of β -D-glucosyl- and β -D-fucosyl-glucoses using β -glycosidase from *Thermus thermophilus*. *Appl. Microbiol. Biotech.* **2001**, 56, (3), 406-410.
85. Kapoor, M.; Gupta, M. N., Lipase Promiscuity and its biochemical applications. *Process Biochemistry* **2012**, (0).
86. Gotor-Fernández, V.; Busto, E.; Gotor, V., *Candida antarctica* Lipase B: An ideal biocatalyst for the preparation of nitrogenated organic compounds. *Adv. Synth. Catal.* **2006**, 348, (7-8), 797-812.
87. Li, C.; Feng, X. W.; Wang, N.; Zhou, Y. J.; Yu, X. Q., Biocatalytic promiscuity: the first lipase-catalysed asymmetric aldol reaction. *Green Chem.* **2008**, 10, 616-618.
88. Branneby, C.; Carlqvist, P.; Magnusson, A.; Hult, K.; Brinck, T.; Berglund, P., Carbon-carbon bonds by hydrolytic enzymes. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, 125, 874-875.
89. Svedendahl, M.; Hult, K.; Berglund, P., Fast carbon-carbon bond formation by a promiscuous lipase. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, 127, 17988-17989.
90. Brady, L.; Brzozowski, A. M.; Derewenda, Z. S.; Dodson, E.; Dodson, G.; Tolley, S.; Turkenburg, J. P. C.; L.; Høge-Jensen, B.; Nørskov, L.; Thim, L.; Menge, U., A serine protease triad forms the catalytic center of a triacylglycerol lipase. *Nature* **1990**, 343, 767-770.
91. Schmid, R. D.; Verger, R., Lipases: interfacial enzymes with attractive applications. *Angew. Chem. Int. Ed.* **1998**, 37, (12), 1608-1633.
92. Murthy, M. S. R. C.; Swaminathan, T.; Rakshit, S. K.; Kosugi, Y., Statistical optimization of lipase catalyzed hydrolysis of methyl oleate by response surface methodology. *Bioprocess Biosyst. Eng.* **2000**, 22, (1), 35-39.
93. Wolfson, A.; Attya, A.; Dlugy, C.; Tavor, D., Glycerol triacetate as solvent and acyl donor in the production of isoamyl acetate with *Candida antarctica* lipase B. *Bioprocess Biosyst. Eng.* **2010**, 33, (3), 363-366.
94. Li, X.-G.; Lähitie, M.; Kanerva, L. T., *Burkholderia cepacia* lipase and activated β -lactams in β -dipeptide and β -amino amide synthesis. *Tetrahedron: Asymmetry* **2008**, 19, (15), 1857-1861.
95. Kirk, O.; Christensen, M. W. r.; Damhus, T.; Godtfredsen, S. E., Enzyme catalyzed degradation and formation of peroxycarboxylic acids. *Biocatal. Biotransform.* **1994**, 11, (1), 65-77.
96. Yadav, G. D.; Borkar, I. V., Lipase-catalyzed hydrazinolysis of phenyl benzoate: Kinetic modeling approach. *Process Biochem.* **2010**, 45, (4), 586-592.
97. Ganske, F.; Bornscheuer, U. T., Lipase-catalyzed glucose fatty acid ester synthesis in ionic liquids. *Organic Letters* **2005**, 7, (14), 3097-3098.

98. Degueil-Castaing, M.; De Jeso, B.; Drouillard, S.; Maillard, B., Enzymatic reactions in organic synthesis: 2- ester interchange of vinyl esters. *Tetrahedron Lett.* **1987**, 28, (9), 953-954.
99. Paravidino, M.; Hanefeld, U., Enzymatic acylation: assessing the greenness of different acyl donors. *Green Chem.* **2011**, 13, (10), 2651-2657.
100. Palocci, C.; Falconi, M.; Chronopoulou, L.; Cernia, E., Lipase-catalyzed regioselective acylation of tritylglycosides in supercritical carbon dioxide. *J. Supercrit. Fluids* **2008**, 45, (1), 88-93.
101. Woudenberg van Oosterom, M.; van Rantwijk, F.; Sheldon, R. A., Regioselective acylation of disaccharides in tert-butyl alcohol catalyzed by *Candida antarctica* Lipase. *Biotech. Bioeng.* **1996**, 49, 328-333.
102. Ferrer, M.; Soliveri, J.; Plou, F. J.; López-Cortés, N.; Reyes-Duarte, D.; Christensen, M.; Copa-Patiño, J. L.; Ballesteros, A., Synthesis of sugar esters in solvent mixtures by lipases from *Thermomyces lanuginosus* and *Candida antarctica* B, and their antimicrobial properties. *Enzym. Microb. Tech.* **2005**, 36, (4), 391-398.
103. Sabeder, S.; Habulin, M.; Knez, Z., Lipase-catalyzed synthesis of fatty acid fructose esters. *J. Food. Eng.* **2006**, 77, (4), 880-886.
104. Gudiño, E. D.; Iribarren, A. M.; Iglesias, L. E., Diastereoselective enzymatic preparation of acetylated pentofuranosides carrying free 5-hydroxyl groups. *Tetrahedron: Asymmetry* **2009**, 20, (15), 1813-1816.
105. Faber, K., *Biotransformations in Organic Chemistry*. 4th ed.; Berlin, 2000.
106. Zaks, A.; Dodds, D. R., Application of biocatalysis and biotransformations to the synthesis of pharmaceuticals. *Drug Disc. Today* **1997**, 2, 513-531
107. Klivanov, A. M., Improving enzymes by using them in organic solvents. *Nature* **2001**, 409, (6817), 241-246.
108. Chanda, A.; Fokin, V. V., Organic Synthesis "On Water". *Chemical Reviews* **2009**, 109, (2), 725-748.
109. Klivanov, A. M., Enzymatic catalysis in anhydrous organic solvents. *Trends in Biochemical Sciences* **1989**, 14, (4), 141-144.
110. De Diego, T.; Lozano, P.; Abad, M. A.; Steffensky, K.; Vaultier, M.; Iborra, J. L., On the nature of ionic liquids and their effects on lipases that catalyze ester synthesis. *J. Biotechnol.* **2009**, 140, (3-4), 234-241.
111. K. Sangeetha, V. B. M. a. T. E. A., *Appl. Catal. A*, **2008**, 341, 168-173.
112. W. Hussain, D. J. P., M. Truppo and G. J. Lye, *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2008**, 55, 19-29.
113. B. Eker, D. Z., G. Zhu, R. J. Linhardt and J. S. Dordick, *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2009**, 59, 177-184.
114. M. M. Musa, K. I. Z.-F., C. Vieille and R. S. Phillips, *Org. Biomol. Chem.* **2008**, 6, 887-892.
115. Krishna, S. H., Developments and trends in enzyme catalysis in nonconventional media. *Biotech. Adv* **2002**, 20, (3-4), 239-267.
116. Girard, E.; Legoy, M. D., Activity and stability of dextranucrase from *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512F in the presence of organic solvents. *Enzyme and Microbial Technology* **1999**, 24, (7), 425-432.
117. Colombo, G.; Carrea, G., Modeling enzyme reactivity in organic solvents and water through computer simulations. *J. Biotechnol.* **2002**, 96, (1), 23-33.
118. Finch, P.; Yoon, J. H., The effects of organic solvents on the synthesis of galactose disaccharides using β -galactosidases. *Carbohydr. Res.* **1997**, 303, (3), 339-345.
119. Laroute, V.; Willemot, R. M., Glucose condensation by glucosamylase in organic-solvents *Biotechnol. Lett.* **1989**, 11, (4), 249-254.

120. Laane, C.; Boeren, S.; Vos, K.; Veeger, C., Rules for optimization of biocatalysis in organic solvents. *Biotechnol. Bioeng.* **1987**, 30, (1), 81-87.
121. Zaks, A.; Klibanov, A. M., The effect of water on enzyme action in organic media. *J. Biol. Chem* **1988**, 263, (17), 8017-21.
122. Carrea, G.; Riva, S., Properties and synthetic applications of enzymes in organic solvents. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2000**, 39, (13), 2226-2254.
123. Yoon, J. H.; McKenzie, D., A comparison of the activities of three β -galactosidases in aqueous-organic solvent mixtures. *Enzym. Microbiol. Tech.* **2005**, 36, (4), 439-446.
124. Majumder, A. B.; Singh, B.; Gupta, M. N., Diastereoselective synthesis of (R)-(alkyl)-beta-D-galactopyranoside by using beta-galactosidase (*Aspergillus oryzae*) in low-water media. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2008**, 18, (1), 124-128.
125. Bridiau, N.; Issaoui, N.; Maugard, T., The effects of organic solvents on the efficiency and regioselectivity of N-acetyl-lactosamine synthesis, using the β -galactosidase from *Bacillus circulans* in hydro-organic media. *Biotechnol. Prog.* **2010**, 26, (5), 1278-1289.
126. Kaftzik, N.; Wasserscheid, P.; Kragl, U., Use of ionic liquids to increase the yield and enzyme stability in the β -galactosidase catalysed synthesis of N-acetyl-lactosamine. *Org. Process Res. Dev.* **2002**, 6, (4), 553-557.
127. Lang, M.; Kamrat, T.; Nidetzky, B., Influence of ionic liquid cosolvent on transgalactosylation reactions catalyzed by thermostable β -glycosylhydrolase celB from *Pyrococcus furiosus*. *Biotech. Bioeng.* **2006**, 95, (6), 1093 - 1100.
128. Singh, N. R.; Narinesingh, D.; Singh, G., Immobilization of β -galactosidase onto Sepharose and stabilization in room temperature ionic liquids. *J. Mol. Liq.* **2010**, 152, (1-3), 19-27.
129. Simeo, Y.; Sinisterra, J. V.; Alcantara, A. R., Regioselective enzymatic acylation of pharmacologically interesting nucleosides in 2-methyltetrahydrofuran, a greener substitute for THF. *Green Chem.* **2009**, 11, (6), 855-862.
130. Flores, M. V.; Halling, P. J., Full model for reversible kinetics of lipase-catalyzed sugar-ester synthesis in 2-methyl 2-butanol. *Biotech. Bioeng.* **2002**, 78, (7), 795-801.
131. Ducret, A.; Giroux, A.; Trani, M.; Lortie, R., Enzymatic preparation of biosurfactants from sugars or sugar alcohols and fatty acids in organic media under reduced pressure. *Biotech. Bioeng.* **1995**, 48, (3), 214-221.
132. Saifuddin, N.; Raziah, A. Z., Enhancement of lipase enzyme activity in Non-aqueous media through a rapid three phase partitioning and microwave Irradiation. *E.-J. Chem.* **2008**, 5, (4), 864-871.
133. Tejo, B. A.; Salleh, A. B.; Pleiss, J., Structure and dynamics of *Candida rugosa* lipase: the role of organic solvent. *J. Mol. Model.* **2004**, 10, (5), 358-366.
134. Cajal, Y.; Svendsen, A.; Girona, V.; Patkar, S. A.; Alsina, M. A., Interfacial control of lid opening in *Thermomyces lanuginosa* lipase. *Biochem.* **1999**, 39, (2), 413-423.
135. Kim, M.-J.; Choi, M. Y.; Lee, J. K.; Ahn, Y., Enzymatic selective acylation of glycosides in ionic liquids: significantly enhanced reactivity and regioselectivity. *J. Mol. Cat. B: Enz.* **2003**, 26, (3-6), 115-118.
136. Lee, S. H.; Ha, S. H.; Dang, D. T.; Chang, W. J.; Koo, Y. M., Lipase-catalyzed synthesis of fatty acid sugar ester using supersaturated sugar solution in ionic liquids. *J. Biotechnol.* **2007**, 131, (2), S88-S88.
137. Lee, S. H.; Ha, S. H.; Hiep, N. M.; Chang, W.-J.; Koo, Y.-M., Lipase-catalyzed synthesis of glucose fatty acid ester using ionic liquids mixtures. *J. Biotechnol.* **2008**, 133, (4), 486-489.

138. Lee, S. H.; Nguyen, H. M.; Koo, Y.-M.; Ha, S. H., Ultrasound-enhanced lipase activity in the synthesis of sugar ester using ionic liquids. *Process Biochem.* **2008**, 43, (9), 1009-1012.
139. Klein, J.; Meinecke, R.; Mayer, M.; Meyer, B., Detecting binding affinity to immobilized receptor proteins in compound libraries by HR-MAS STD NMR. *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, 121, (22), 5336-5337.
140. Wang, Y.-S.; Liu, D.; Wyss, D. F., Competition STD NMR for the detection of high-affinity ligands and NMR-based screening. *Magnetic Resonance in Chemistry* **2004**, 42, (6), 485-489.
141. Wen, X.; Yuan, Y.; Kuntz, D. A.; Rose, D. R.; Pinto, B. M., A combined STD-NMR/Molecular modeling protocol for predicting the binding modes of the glycosidase inhibitors kifunensine and salacinol to golgi α -Mannosidase II. *Biochem.* **2005**, 44, (18), 6729-6737.
142. D. G. Myszka, Kinetic analysis interactions using surface plasmon resonance. *Curr. Opin. Biotechnol.* **1997**, 8, 50-57.
143. Pattnaik, P., Surface Plasmon Resonance: Applications in Understanding Receptor-Ligand Interaction. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **2005**, 126, 79-92.
144. Pattnaik, P., Surface plasmon resonance. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **2005**, 126, (2), 79-92.
145. Homola, J., Surface plasmon resonance sensors for detection of chemical and biological Species. *Chem. Rev.* **2008**, 108, (2), 462-493.
146. Blandamer, M. J.; Cullis, P. M.; Engberts, J. B. F. N., Titration microcalorimetry. *Journal of the Chemical Society, Faraday Transactions* **1998**, 94, (16).
147. Leavitt, S.; Freire, E., Direct measurement of protein binding energetics by isothermal titration calorimetry. *Curr. Opin. Struc. Biol.* **2001**, 11, (5), 560-566.
148. Frazier, R.; Papadopoulou, A.; Green, R. J., Isothermal titration calorimetry study of epicatechin binding to serum albumin. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2006**, 41, 1602-1605.
149. Girard, M.; Turgeon, S. L.; Gauthier, S. F., Thermodynamic parameters of β -lactoglobulin-pectin complexes assessed by isothermal titration calorimetry. *J. Agric. Food Chem.* **2003**, 51, (15), 4450-4455.
150. Zhou, Y.; Gregor, V. E.; Sun, Z.; Ayida, B. K.; Winters, G. C.; Murphy, D.; Simonsen, K. B.; Vourloumis, D.; Fish, S.; Froelich, J. M.; Wall, D.; Hermann, T., Structure-guided discovery of novel aminoglycoside mimetics as antibacterial translation inhibitors. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2005**, 49, (12), 4942-4949.
151. Thomas, C. J.; Surolia, N.; Surolia, A., Kinetic and thermodynamic analysis of the interactions of 23-residue peptides with endotoxin. *J. Biol. Chem* **2001**, 276, (38), 35701-35706.
152. Turnbull, W. B.; Daranas, A. H., On the value of c: Can low affinity systems be studied by isothermal titration calorimetry? *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, 125, (48), 14859-14866.
153. Søren N, O., Applications of isothermal titration calorimetry to measure enzyme kinetics and activity in complex solutions. *Thermochim. Acta* **2006**, 448, (1), 12-18.
154. Sreerama, N.; Woody, R. W.; Ludwig, B.; Michael, L. J., Computation and analysis of protein circular dichroism spectra. In *Methods in Enzymology*, Academic Press: 2004; Vol. Volume 383, pp 318-351.
155. Peng, Z. G.; Hidajat, K.; Uddin, M. S., Conformational change of adsorbed and desorbed bovine serum albumin on nano-sized magnetic particles. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **2004**, 33, (1), 15-21.

156. Chen, Y.-H.; Yang, J. T.; Chau, K. H., Determination of the helix and β form of proteins in aqueous solution by circular dichroism. *Biochemistry* **1974**, 13, (16), 3350-3359.
157. Michalet, X.; Weiss, S.; Jäger, M., Single-molecule fluorescence studies of protein folding and conformational dynamics. *Chem. Rev.* **2006**, 106, (5), 1785-1813.
158. Vivian, J. T.; Callis, P. R., Mechanisms of tryptophan fluorescence shifts in proteins. *Biophys. J.* **2001**, 80, (5), 2093-2109.
159. Altschul, S. F.; Gish, W.; Miller, W.; Myers, E. W.; Lipman, D. J., Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* **1990**, 215, (3), 403-410.
160. Bernstein, F. C.; Koetzle, T. F.; Williams, G. J. B.; Meyer Jr, E. F.; Brice, M. D.; Rodgers, J. R.; Kennard, O.; Shimanouchi, T.; Tasumi, M., The protein data bank: A computer-based archival file for macromolecular structures. *J. Mol. Biol.* **1977**, 112, (3), 535-542.
161. Pearson, W. R.; Lipman, D. J., Improved tools for biological sequence comparison. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1988**, 85, (8), 2444-2448.
162. Gasteiger, E.; Hoogland, C.; Gattiker, A.; Duvaud, S.; Wilkins, M. R.; Appel, R. D.; Bairoch, A., Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server; . In *The Proteomics Protocols Handbook*, Walker, J. M., Ed. Humana Press: 2005; pp pp. 571-607
163. Boeckmann, B.; Bairoch, A.; Apweiler, R.; Blatter, M. C.; Estreicher, A.; Gasteiger, E.; Martin, M. J.; Michoud, K.; O'Donovan, C.; Phan, I.; Pilbout, S.; Schneider, M., The SWISS-PROT protein knowledgebase and its supplement TrEMBL in 2003. *Nucleic Acids Research* **2003**, 31, (1), 365-370.
164. Cantarel, B. L.; Coutinho, P. M.; Rancurel, C.; Bernard, T.; Lombard, V.; Henrissat, B., The Carbohydrate-Active EnZymes database (CAZy): an expert resource for Glycogenomics. *Nucleic Acids Res.* **2009**, 37, (D), 233-238.
165. Edgar, R. C., MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Research* **2004**, 32, (5), 1792-1797.
166. Schwede, T.; Kopp, J. r.; Guex, N.; Peitsch, M. C., SWISS-MODEL: an automated protein homology-modeling server. *Nucleic Acids Research* **2003**, 31, (13), 3381-3385.
167. Arnold, K.; Bordoli, L.; Kopp, J.; Schwede, T., The SWISS-MODEL workspace: a web-based environment for protein structure homology modelling. *Bioinformatics* **2006**, 22, (2), 195-201.
168. Nielsen, M.; Lundegaard, C.; Lund, O.; Petersen, T. N., CPHmodels-3.0-remote homology modeling using structure-guided sequence profiles. *Nucl. Acids Res.* **2010**, 38, (suppl 2), W576-W581.
169. Hidaka, M.; Fushinobu, S.; Ohtsu, N.; Motoshima, H.; Matsuzawa, H.; Shoun, H.; Wakagi, T., Trimeric crystal structure of the glycoside hydrolase family 42 β -galactosidase from *Thermus thermophilus* A4 and the structure of its complex with galactose. *J. Mol. Biol.* **2002**, 322, (1), 79-91.
170. Damm, K.; Carlson, H., Gaussian-Weighted RMSD Superposition of Proteins: A Structural Comparison for Flexible Proteins and Predicted Protein Structures. *Biophys J.* **2006**, 90, (12), 4558-4573.
171. Armougom, F.; Moretti, S.; Keduas, V.; Notredame, C., The iRMSD: a local measure of sequence alignment accuracy using structural information. *Bioinformatics* **2006**, 22, (14), e35-e39.
172. Edgar, R. C., Quality measures for protein alignment benchmarks. *Nucleic Acids Res.* **2010**, 38, (7), 2145-2153.

173. Morris, G. M.; Huey, R.; Lindstrom, W.; Sanner, M. F.; Belew, R. K.; Goodsell, D. S.; Olson, A. J., AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility. *J. Comput. Chem.* **2009**, 30, (16), 2785-2791.
174. Schüttelkopf, A.; van Aalten, D., PRODRG: a tool for high-throughput crystallography of protein-ligand complexes. *Acta Crystallogr., Sect. C: Cryst. Struct. Commun.* **2004**, 60, (8), 1355-1363.
175. Janssen, C. L.; Nielsen, I. B.; Leininger, M. L.; Valeev, E. F.; Seidl, E. T., The Massively Parallel Quantum Chemistry Program (MPQC), version 2.3. 1. *Sandia National Laboratories: Livermore, CA, USA* **2004**.
176. Hess, B.; Kutzner, C.; Van Der Spoel, D.; Lindahl, E., GROMACS 4: Algorithms for highly efficient, load-balanced, and scalable molecular simulation. *Journal of chemical theory and computation* **2008**, 4, (3), 435-447.
177. Hill, A. D.; Reilly, P. J., Computational analysis of glycoside hydrolase family 1 specificities. *Biopolymers* **2008**, 89, (11), 1021-1031.
178. Brás, N.; Fernandes, P.; Ramos, M., Docking and molecular dynamics studies on the stereoselectivity in the enzymatic synthesis of carbohydrates. *Theor. Chem. Acc.* **2009**, 122, (5), 283-296.
179. Norde, W.; MacRitchie, F.; Nowicka, G.; Lykelma, J., Protein adsorption at solid-liquid interfaces: reversibility and conformation aspects. *J. Colloid Interface Sci.* **1986**, 112, 447-456.
180. Klibanov, A. M., Immobilized enzymes and cells as practical catalysts. *Science* **1983**, 219, (4585), 722-727.
181. Lamb, S. B.; Stuckey, D. C., Enzyme immobilization on colloidal liquid aphrons (CLAs): the influence of system parameters on activity. *Enzym. Microb. Tech.* **2000**, 26, (8), 574-581.
182. Bornscheuer, U. T., Immobilizing enzymes: How to create more suitable biocatalysts. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, 42, (29), 3336-3337.
183. Tischer, W.; Kascher, V., Immobilized enzymes: crystals or carriers? *TIBTECH* **1999**, 17, 326-335.
184. Spieß, A.; Schlothauer, R. C.; Hinrichs, J.; Scheidat, B.; Kasche, V., pH gradients in immobilized amidases and their influence on rates and yields of β -lactam hydrolysis. *Biotech. Bioeng.* **1999**, 62, (3), 267-277.
185. Sheldon, R. A., Enzyme immobilization: The quest for optimum performance. *Adv. Synth. Catal.* **2007**, 349, (8-9), 1289-1307.
186. Cetinus, S. A.; Öztö, H. N.; Saraydin, D., Immobilization of catalase onto chitosan and cibacron blue F3GA attached chitosan beads. *Enzym. Microb. Tech.* **2007**, 41, (4), 447-454.
187. Pan, C.; Hu, B.; Li, W.; Sun, Y.; Ye, H.; Zeng, X., Novel and efficient method for immobilization and stabilization of β -D-galactosidase by covalent attachment onto magnetic Fe_3O_4 -chitosan nanoparticles. *J. Mol. Cat. B: Enz.* **2009**, 61, (3-4), 208-215.
188. Barbara, K., Application of chitin- and chitosan-based materials for enzyme immobilizations: a review. *Enzym. Microb. Tech.* **2004**, 35, (2-3), 126-139.
189. Chiou, S.-H.; Wu, W.-T., Immobilization of *Candida rugosa* lipase on chitosan with activation of the hydroxyl groups. *Biomaterials* **2004**, 25, (2), 197-204.
190. Torres, R.; Mateo, C.; Fernández-Lorente, G.; Ortiz, C.; Fuentes, M.; Palomo, J. M.; Guisán, J. M.; Fernández-Lafuente, R., A novel heterofunctional epoxy-amino sephabeads for a new enzyme immobilization protocol: immobilization-stabilization of β -Galactosidase from *Aspergillus oryzae*. *Biotechnol. Prog.* **2003**, 19, (3), 1056-1060.
191. Pessela, B. C. C.; Fernández-Lafuente, R.; Fuentes, M.; Vián, A.; García, J. L.; Carrascosa, A. V.; Mateo, C.; Guisán, J. M., Reversible immobilization of a thermophilic

- β -galactosidase via ionic adsorption on PEI-coated Sepabeads. *Enzym. Microb. Tech.* **2003**, 32, (3&4), 369-374.
192. Mateo, C.; Abian, O.; Fernández-Lorente, G.; Pedroche, J.; Fernández-Lafuente, R.; Guisan, J. M., Epoxy sepabeads: A novel epoxy support for stabilization of industrial enzymes via very intense multipoint covalent attachment. *Biotechnol. Prog.* **2002**, 18, (3), 629-634.
193. Boller, T.; Meier, C.; Menzler, S., Eupergit oxirane acrylic Beads: how to make enzymes fit for biocatalysis. *Org. Process Res. Dev.* **2002**, 6, (4), 509-519.
194. Mateo, C.; Fernández-Lorente, G.; Abian, O.; Fernández-Lafuente, R.; Guisán, J. M., Multifunctional epoxy supports: A new tool to improve the covalent immobilization of proteins. The promotion of physical adsorptions of proteins on the supports before their covalent linkage. *Biomacromolecules* **2000**, 1, (4), 739-745.
195. Lu, J.; Toy, P. H., Organic polymer supports for synthesis and for reagent and catalyst immobilization. *Chem. Rev.* **2009**, 109, (2), 815-838.
196. Fan, J.; Lei, J.; Wang, L.; Yu, C.; Tu, B.; Zhao, D., Rapid and high-capacity immobilization of enzymes based on mesoporous silicas with controlled morphologies. *Chem. Commun.* **2003**, (17).
197. Wang, Y.; Caruso, F., Mesoporous silica spheres as supports for enzyme immobilization and encapsulation. *Chem. Mater.* **2005**, 17, (5), 953-961.
198. Luckarift, H. R.; Spain, J. C.; Naik, R. R.; Stone, M. O., Enzyme immobilization in a biomimetic silica support. *Nat Biotech* **2004**, 22, (2), 211-213.
199. Salis, A.; Meloni, D.; Ligas, S.; Casula, M. F.; Monduzzi, M.; Solinas, V.; Dumitriu, E., Physical and chemical adsorption of *Mucor javanicus* lipase on SBA-15 mesoporous silica. Synthesis, structural characterization, and activity performance. *Langmuir* **2005**, 21, (12), 5511-5516.
200. Petkar, M.; Lali, A.; Caimi, P.; Daminati, M., Immobilization of lipases for non-aqueous synthesis. *J. Mol. Cat. B: Enz.* **2006**, 39, (1-4), 83-90.
201. Mateo, C.; Abian, O.; Fernandez-Lafuente, R.; Guisan, J. M., Reversible enzyme immobilization via a very strong and nondistorting ionic adsorption on support-polyethylenimine composites. *Biotech. Bioeng.* **2000**, 68, (1), 98-105.
202. Akgöl, S.; Denizli, A., Novel metal-chelate affinity sorbents for reversible use in catalase adsorption. *J. Mol. Cat. B: Enz.* **2004**, 28, (1), 7-14.
203. Akkaya, B.; Uzun, L.; Candan, F.; Denizli, A., N-methacryloyl-(l)-histidine methyl ester carrying porous magnetic beads for metal chelate adsorption of cytochrome c. *Mater. Sci. Eng., C* **2007**, 27, (1), 180-187.
204. Santora, B. P.; Gagné, M. R.; Moloy, K. G.; Radu, N. S., Porogen and cross-linking effects on the surface area, pore volume distribution, and morphology of macroporous polymers obtained by bulk polymerization. *Macromolecules* **2001**, 34, (3), 658-661.
205. Svec, F., Preparation and HPLC applications of rigid macroporous organic polymer monoliths. *J. Sep. Sci.* **2004**, 27, (10-11), 747-766.
206. Miletic, N.; Vukovic, Z.; Nastasovic, A.; Loos, K., Macroporous poly(glycidyl methacrylate-co-ethylene glycol dimethacrylate) resins: A versatile immobilization supports for biocatalysts. *J. Mol. Cat. B: Enz.* **2009**, 56, (4), 196-201.
207. Milosavic, N.; Prodanovic, R.; Jovanovic, S.; Vujcic, Z., Immobilization of glucoamylase via its carbohydrate moiety on macroporous poly(GMA-co-EGDMA). *Enzym. Microb. Tech.* **2007**, 40, (5), 1422-1426.
208. Koilpillai, L.; Gadre, R. A.; Bhatnagar, S.; Raman, R. C.; Ponrathnam, S.; Kumar, K. K.; Ambekar, G. R.; Shewale, J. G., Immobilization of penicillin G acylase on methacrylate polymers. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **1990**, 49, (2), 173-182.

209. Prodanović, R.; Jovanović, S.; Vujčić, Z., Immobilization of invertase on a new type of macroporous glycidyl methacrylate. *Biotechnol. Lett.* **2001**, 23, (14), 1171-1174.
210. Vaidya, B. K.; Ingavle, G. C.; Ponrathnam, S.; Kulkarni, B. D.; Nene, S. N., Immobilization of *Candida rugosa* lipase on poly(allyl glycidyl ether-co-ethylene glycol dimethacrylate) macroporous polymer particles. *Bioresour. Technol.* **2008**, 99, (9), 3623-3629.
211. Miletic, N.; Rohandi, R.; Vuković, Z.; Nastasovic, A.; Loos, K., Surface modification of macroporous poly(glycidyl methacrylate-co-ethylene glycol dimethacrylate) resins for improved *Candida antarctica* lipase B immobilization. *React. Funct. Polym.* **2009**, 69, (1), 68-75.
212. Mateo, C.; Grazú, V.; Pessela BC; Montes, T.; Palomo, J. M.; Torres, R.; López-Gallego, F.; Fernández-Lafuente, R.; Guisán, J. M., Advances in the design of new epoxy supports for enzyme immobilization-stabilization. *Biochem. Soc. Trans.* **2007**, 35, 1593-601.
213. Cerdobbel, A.; Desmet, T.; De Winter, K.; Maertens, J.; Soetaert, W., Increasing the thermostability of sucrose phosphorylase by multipoint covalent immobilization. *J. Biotechnol.* **2010**, 150, (1), 125-130.
214. Ghazi, I.; De Segura, A. G.; Fernández-Arrojo, L.; Alcalde, M.; Yates, M.; Rojas-Cervantes, M. L.; Plou, F. J.; Ballesteros, A., Immobilisation of fructosyltransferase from *Aspergillus aculeatus* on epoxy-activated Sepabeads EC for the synthesis of fructo-oligosaccharides. *J. Mol. Cat. B: Enz.* **2005**, 35, (1-3), 19-27.
215. Torres, P.; Batista-Viera, F., Immobilization of β -galactosidase from *Bacillus circulans* onto epoxy-activated acrylic supports. *J. Mol. Cat. B: Enz.* **2012**, 74, (3-4), 230-235.
216. Katchalski-Katzir, E.; Kraemer, D. M., Eupergit® C, a carrier for immobilization of enzymes of industrial potential. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* **2000**, 10, (1-3), 157-176.
217. Tu, M.; Zhang, X.; Kurabi, A.; Gilkes, N.; Mabee, W.; Saddler, J., Immobilization of β -glucosidase on Eupergit C for lignocellulose hydrolysis. *Biotechnol. lett.* **2006**, 28, (3), 151-156.
218. Hernaiz, M. J.; Crout, D. H. G., Immobilization/stabilization on Eupergit C of the beta-galactosidase from B-circulans and an alpha-galactosidase from *Aspergillus oryzae*. *Enzym. Microbiol. Tech.* **2000**, 27, (1-2), 26-32.
219. Knezevic, Z.; Milosavic, N.; Bezbradica, D.; Jakovljevic, Z.; Prodanovic, R., Immobilization of lipase from *Candida rugosa* on Eupergit® C supports by covalent attachment. *Biochem. Eng. Jour.* **2006**, 30, (3), 269-278.
220. Guisán, J. M., Aldehyde-agarose gels as activated supports for immobilization-stabilization of enzymes. *Enzym. Microb. Tech.* **1988**, 10, 375-382.
221. Mateo, C.; Palomo, J. M.; Fuentes, M.; Betancor, L.; Grazu, V.; López-Gallego, F.; Pessela, B. C. C.; Hidalgo, A.; Fernández-Lorente, G.; Fernández-Lafuente, R.; Guisán, J. M., Glyoxyl agarose: A fully inert and hydrophilic support for immobilization and high stabilization of proteins. *Enzym. Microb. Tech.* **2006**, 39, (2), 274-280.
222. Mateo, C.; Bolivar, J. M.; Godoy, C. A.; Rocha-Martin, J.; Pessela, B. C.; Curiel, J. A.; Muñoz, R.; Guisan, J. M.; Fernández-Lorente, G., Improvement of enzyme properties with a two-step immobilization process on novel heterofunctional supports. *Biomacromolecules* **2010**, 11, (11), 3112-3117.
223. Vieille, C.; Zeikus, G. J., Hyperthermophilic Enzymes: Sources, Uses, and Molecular Mechanisms for Thermostability. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **2001**, 65, (1), 1-43.

224. Betancor, L.; López-Gallego, F.; Alonso-Morales, N.; Dellamora, G.; Mateo, C.; R., F.-L.; Guisán, J. M., Glutaraldehyde in protein immobilization a versatile reagent. *Methods in Biotechnology* **2006**, 22, 57-64.
225. Walt, D. R.; Agayn, V. I., The chemistry of enzyme and protein immobilization with glutaraldehyde. *TrAC, Trends Anal. Chem.* **1994**, 13, (10), 425-430.
226. Sheldon, R. A., Cross-linked enzyme aggregates (CLEA's): stable and recyclable biocatalysts. *Biochem. Soc. Trans.* **2007**, 35, 1583-1587.
227. Migneault, I.; Dartiguenave, C.; Bertrand, M. J.; Waldron, K. C., Glutaraldehyde: behavior in aqueous solution, reaction with proteins, and application to enzyme crosslinking *BioTechniques* **2004**, 37, 790-802
228. Walt, D. R.; Agayn, V. I., The chemistry of enzyme and protein immobilization with glutaraldehyde. *TrAC, Trends Anal. Chem.* **1994**, 13, (10), 425-430.
229. Shah, S.; Sharma, A.; Gupta, M. N., Preparation of cross-linked enzyme aggregates by using bovine serum albumin as a proteic feeder. *Anal. Biochem.* **2006**, 351, (2), 207-213.
230. Wilson, L.; Illanes, A.; Soler, L.; Henríquez, M. J., Effect of the degree of cross-linking on the properties of different CLEAs of penicillin acylase. *Process Biochem.* **2009**, 44, (3), 322-326.
231. Schoevaart, R.; Wolbers, M. W.; Golubovic, M.; Ottens, M.; Kieboom, A. P. G.; van Rantwijk, F.; van der Wielen, L. A. M.; Sheldon, R. A., Preparation, optimization, and structures of cross-linked enzyme aggregates (CLEAs). *Biotech. Bioeng.* **2004**, 87, (6), 754-762.
232. Faijes, M.; Saura-Valls, M.; Pérez, X.; Conti, M.; Planas, A., Acceptor-dependent regioselectivity of glycosynthase reactions by *Streptomyces* E383A β -glucosidase. *Carb. Res.* **2006**, 341, (12), 2055-2065.
233. Maugard, T.; Gaunt, D.; Legoy, M. D.; Besson, T., Microwave-assisted synthesis of galacto-oligosaccharides from lactose with immobilized β -galactosidase from *Kluyveromyces lactis*. *Biotechnol. lett.* **2003**, 25, (8), 623-629.
234. Hernaiz, M. J.; Crout, D. H. G., A highly selective synthesis of *N*-acetyllactosamine catalyzed by immobilised β -galactosidase from *Bacillus circulans*. *J. Mol. Catal. B. Enzym.* **2000**, 10, (4), 403-408.
235. Naundorf, A.; Caussette, M.; Ajisaka, K., Characterization of the Immobilized β -Galactosidase C from *Bacillus circulans* and the production of $\beta(1\rightarrow3)$ -linked disaccharides. *Bios. Biotech. Biochem.* **1998**, 62, (7), 1313-1317.
236. Pan, C.; Hu, B.; Li, W.; Sun, Y.; Ye, H.; Zeng, X., Novel and efficient method for immobilization and stabilization of β -D-galactosidase by covalent attachment onto magnetic Fe_3O_4 -chitosan nanoparticles. *J. Mol. Cat. B: Enz.* **2009**, 61, (3-4), 208-215.
237. Ponrasu, T.; Manohar, B.; Divakar, S., A response surface methodological study on prediction of glucosylation yields of thiamin using immobilized β -glucosidase. *Process Biochem.* **2009**, 44, (2), 251-255.
238. Hestrin, S.; Feingold, D. S.; Schramm, M., β -Glucosidase from sweet almond emulsin. . In *Methods in enzymology.* , Colowick, S. P.; Kaplan, N. O., Eds. Academic Press: New York . 1995; pp 234-240.
239. Won, K.; Kim, S.; Kim, K.-J.; Park, H. W.; Moon, S.-J., Optimization of lipase entrapment in Ca-alginate gel beads. *Process Biochem.* **2005**, 40, (6), 2149-2154.
240. Hernaiz, M. J.; Crout, D. H. G., Immobilization/stabilization on Eupergit C of the β -galactosidase from *B. circulans* and an α -galactosidase from *Aspergillus oryzae*. *Enzym. Microbiol. Tech.* **2000**, 27, (1-2), 26-32.
241. Palomo, J. M.; Muñoz, G.; Fernández-Lorente, G.; Mateo, C.; Fernández-Lafuente, R.; Guisán, J. M., Interfacial adsorption of lipases on very hydrophobic support

- (octadecyl-Sepabeads): immobilization, hyperactivation and stabilization of the open form of lipases. *J. Mol. Cat. B: Enz.* **2002**, 19-20, (0), 279-286.
242. Ganske, F.; Bornscheuer, U. T., Optimization of lipase-catalyzed glucose fatty acid ester synthesis in a two-phase system containing ionic liquids and t-BuOH. *J. Mol. Cat. B: Enz.* **2005**, 36, (1-6), 40-42.
243. Cabrera, Z.; Fernandez-Lorente, G.; Fernandez-Lafuente, R.; Palomo, J. M.; Guisan, J. M., Novozym 435 displays very different selectivity compared to lipase from *Candida antarctica* B adsorbed on other hydrophobic supports. *J. Mol. Cat. B: Enz.* **2009**, 57, (1-4), 171-176.
244. Palomo, J. M.; Muñoz, G.; Fernández-Lorente, G.; Mateo, C.; Fernández-Lafuente, R.; Guisán, J. M., Interfacial adsorption of lipases on very hydrophobic support (octadecyl-Sepabeads): immobilization, hyperactivation and stabilization of the open form of lipases. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* **2002**, 19-20, (0), 279-286.
245. Fernández-Lorente, G.; Palomo, J. M.; Cabrera, Z.; Guisán, J. M.; Fernández-Lafuente, R., Specificity enhancement towards hydrophobic substrates by immobilization of lipases by interfacial activation on hydrophobic supports. *Enzym. Microb. Tech.* **2007**, 41, (5), 565-569.
246. de Grado, M.; Castan, P.; Berenguer, J., A high-transformation-efficiency cloning vector for *Thermus thermophilus*. *Plasmid* **1999**, 42, (3), 241-245.
247. Ramirez-Arcos, S., Fernandez-Herrero, L.A., Marin, I., and Berenguer, J., Anaerobic growth, a property horizontally transferred by an Hfr-like mechanism among extreme thermophiles. *J. Bacteriol.* **1998**, 180, 3137-3143.
248. Agarose Beads Technologies, Affinity His-Tag Purification. Procedure for use chelating agarose beads Bulk Resins. In www.abtbeads.com, 2010 pp 1-4.
249. QUIAGEN, *The QIAexpressionist™. A handbook for high-level expression and purification of 6xHis-tagged proteins.* 2003.
250. Laemmli, U. K., Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature* **1970**, 227, (5259), 680-685.
251. Bradford, M. M., A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **1976**, 72, (1-2), 248-254.
252. Granados, R., Melendez, E., *Química orgánica simplificada.* Editorial Reverté: Barcelona, 1992.
253. Fourage, L.; Helbert, M.; Nicolet, P.; Colas, B., Temperature Dependence of the Ultraviolet-Visible Spectra of Ionized and Un-ionized Forms of Nitrophenol: Consequence for the Determination of Enzymatic Activities Using Nitrophenyl Derivatives. A Warning. *Anal. Biochem.* **1999**, 270, (1), 184-185.
254. Muñoz, F. J. Síntesis quimio-enzimática de oligosacáridos de interés terapeutico. Universidad Complutense de Madrid., Madrid, 2005.
255. Bridiau, N.; Maugard, T., A comparative study of the regioselectivity of the β -galactosidases from *Kluyveromyces lactis* and *Bacillus circulans* in the enzymatic synthesis of N-Acetyl-lactosamine in aqueous media. *Biotechnol. Prog.* **2011**, 27, (2), 386-394.
256. Schwede, T.; Kopp, J.; Guex, N.; Peitsch, M. C., SWISS-MODEL: an automated protein homology-modeling server. *Nucleic Acids Res.* **2003**, 31, (13), 3381-3385.
257. Bates, P. A.; Kelley, L. A.; MacCallum, R. M.; Sternberg, M. J. E., Enhancement of protein modeling by human intervention in applying the automatic programs 3D-JIGSAW and 3D-PSSM. *Proteins: Struct., Funct., Bioinf.* **2001**, 45, (S5), 39-46.

258. Laskowski, R. A.; MacArthur, M. W.; Moss, D. S.; Thornton, J. M., PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures. *J. Appl. Crystallogr* **1993**, 26, (2), 283-291.
259. Colovos, C.; Yeates, T., Verification of protein structures: patterns of nonbonded atomic interactions. *Prot. Sci.* **1993**, 2, 1511-1519.
260. Juers, D. H.; Heightman, T. D.; Vasella, A.; McCarter, J. D.; Mackenzie, L.; Withers, S. G.; Matthews, B. W., A structural view of the action of *Escherichia coli* (lacZ) β -galactosidase. *Biochem.* **2001**, 40, (49), 14781-14794.
261. Hong, D.-P.; Hoshino, M.; Kuboi, R.; Goto, Y., Clustering of fluorine-substituted alcohols as a factor responsible for their marked effects on proteins and peptides. *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, 121, (37), 8427-8433.
262. Sandoval, M.; Ferreras, E.; Pérez-Sánchez, M.; Berenguer, J.; Sinisterra, J. V.; Hernaiz, M. J., Screening of strains and recombinant enzymes from *Thermus thermophilus* for their use in disaccharide synthesis. *Jour. Mol. Cat. B Enz.* **2012**, 74, 162-169.
263. Moreno, R.; Zafra, O.; Cava, F.; Berenguer, J., Development of a gene expression vector for *Thermus thermophilus* based on the promoter of the respiratory nitrate reductase. *Plamid* **2003**, 49, 2-8.
264. Sheldon, R. A.; Lau, R. M.; Sorgedraeger, M. J.; van Rantwijk, F.; Seddon, K. R., Biocatalysis in ionic liquids. *Green Chem.* **2002**, 4, (2), 147-151.
265. Schüttelkopf, A.; van Aalten, D., PRODRG: a tool for high-throughput crystallography of protein-ligand complexes. *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography* **2004**, 60, (8), 1355-1363.
266. Kumar, A., Estimates of internal pressure and molar refraction of imidazolium based ionic liquids as a function of temperature. *J. Solution Chem.* **2008**, 37, (2), 203-214.
267. Swiderski, K.; McLean, A.; Gordon, C.; Vaughan, D., Estimates of internal energies of vaporisation of some room temperature ionic liquids. *Chem. Commun.* **2004**, 2004, (19), 2178-2179.
268. Pereiro, A.; Legido, J., Physical properties of ionic liquids based on 1-alkyl-3-methylimidazolium cation and hexafluorophosphate as anion and temperature dependence. *J. Chem. Thermodyn.* **2007**, 39, (8), 1168-1175.
269. Armstrong, J.; Hurst, C.; Jones, R.; Licence, P.; Lovelock, K.; Satterley, C.; Villar-García, I., Vapourisation of ionic liquids. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2007**, 9, (8), 982-990.
270. Liu, Z.; Wu, X.; Wang, W., A novel united-atom force field for imidazolium-based ionic liquids. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2006**, 8, (9), 1096-1104.
271. Amadei, A.; Linssen, A. B. M.; Berendsen, H. J. C., Essential dynamics of proteins. *Proteins: Struct. Funct. Bioinf.* **1993**, 17, (4), 412-425.
272. Pérez-Sánchez, M.; Sandoval, M.; Cortés-Cabrera, A.; García-Marín, H.; Sinisterra, J. V.; García, J. I.; Hernaiz, M. J., Solvents derived from glycerol modify classical regioselectivity in the enzymatic synthesis of disaccharides with Biolacta β -galactosidase. *Green Chem.* **2011**, 13, 2810-2817.
273. Pérez-Sánchez, M.; Sandoval, M.; Hernáiz, M. J., Bio-solvents change regioselectivity in the synthesis of disaccharides using Biolacta β -galactosidase. *Tetrahedron* **2012**, 68, (9), 2141-2145.
274. Farkas, E.; Thiem, J., Enzymatic synthesis of galactose-containing disaccharides employing beta-galactosidase from *Bacillus circulans*. *Eur. J. Org. Chem.* **1999**, (11), 3073-3077.

275. Yanahira, S.; Yabe, Y.; Nakakoshi, M.; Miura, S.; Matsubara, N.; Ishikawa, H., Structures of novel acidic galactooligosaccharides synthesized by *Bacillus circulans* β -Galactosidase. *Bios. Biotech. Biochem.* **1998**, 62, (9), 1791-1794.
276. Muñoz, F. J. Síntesis quimioenzimática de glicoconjugados y estudio cuantitativo de su implicación en procesos de reconocimiento molecular Universidad Complutense de Madrid, Madrid, 2008.
277. Mainar, A. M. P., J.; García, J. I.; Royo, F. M.; Urieta, J. S., Solubility of gases in fluoroorganic alcohols. Part I. Solubilities of several non polar gases in 1, 1, 1, 3, 3, 3, hexafluoropropan at 298.15 K and 101.33 kPa. *J. Chem. Soc. Faraday Trans.* **1998**, 94, 3595-3599.
278. Laurence, C.; Nicolet, P.; Reichardt, C., *Bull. Soc. Chim. Fr.* **1987**, 1001-1005.
279. Pérez-Sánchez, M.; Sandoval, M.; Hernáiz, M. J., Bio-solvents change regioselectivity in the synthesis of disaccharides using Biolacta β -galactosidase. **68** **2012**, 2141-2145.
280. Zahner, D.; Hakenbeck, R., The *Streptococcus pneumoniae* β -Galactosidase Is a Surface Protein. *J. Bacteriol.* **2000**, 182, (20), 5919-5921.
281. Ajisaka, K.; Fujimoto, H.; Isomura, M., Regioselective transglycosylation in the synthesis of oligosaccharides: comparison of β -galactosidases and sialidases of various origins. *Carbohydr. Res.* **1994**, 259, (1), 103-115.
282. Zeleny, R.; Altmann, F.; Praznik, W., A capillary electrophoretic study on the specificity of β -galactosidases from *Aspergillus oryzae*, *Escherichia coli*, *Streptococcus pneumoniae*, and *Canavalia ensiformis* (jack bean). *Anal. Biochem.* **1997**, 246, (1), 96-101.
283. Spiwok, V.; Lipovová, P.; Skálová, T.; Buchtelová, E.; Hasek, J.; Králová, B., Role of CH/ π interactions in substrate binding by *Escherichia coli* β -galactosidase. *Carbohydr. Res.* **2004**, 339, (13), 2275-2280.
284. Tran, V.; Hoffmann, L.; Rabiller, C.; Tellier, C.; Dion, M., Rational desing of a GHI β -glycosidase to prevent self-condensation during the transglycosylation reaction. *Protein Eng. Des. Sel.* **2010**, 23, (1), 43-49.
285. Sakai, K.; Tanaka, M.; Tachiki, T.; Kumagai, H.; Tochikura, T., Increase in β -D-glucoside-assimilating ability of *Bifidobacterium breve* 203 due to aclimation to β -D-glucoside. *Agric. Biol. Chem.* **1987**, 51, (3), 699-705.
286. Nunoura, N.; Ohdan, K.; Yano, T.; Yamamoto, K.; Kumagai, H., Purification and Characterization of β -D-Glucosidase (β -D-fucosidase) from *Bfidobacterium breve* clb Acclimated to cellobiose. *Biosci Biotechnol Biochem* **1996**, 60, (2), 188-193.
287. Nunoura, N.; Ohdan, K.; Yamamoto, K.; Kumagai, H., Expression of the β -D-Glucosidase I gene in *Bifidobacterium breve* 203 during Acclimation to Cellobiose *J. Ferment. Bioeng.* **1997**, 83, (4), 309-314.
288. Porath J, C. J., Olsson I, Belfrage G., Metal chelate affinity chromatography, a new approach to protein fractionation. *Nature* **1975**, 258, (5536), 598-599.
289. Yoo, J.; Han, K.-W.; Kim, H.-K.; Kim, M.-H.; Kwon, S.-T., Purification and Characterization of a Thermostable β -Glycosidase from *Thermus caldophilus* GK24. *J. Microbiol. Biotechnol.* **2000**, 10, (5), 638-642.
290. P. Masson, B. P., and A. Andrén-Sandberg, Cancer-associated tumour markers CA 19-9 and CA-50 in patients with pancreatic cancer with special reference to the Lewis blood cell status. *Br J Cancer.* **1990**, 62, ((1)), 118-121. .
291. Fredlake, C. P.; Crosthwaite, J. M.; Hert, D. G.; Aki, S. N. V. K.; Brennecke, J. F., Thermophysical properties of imidazolium-based ionic liquids. *J. Chem. Eng. Data* **2004**, 49, (4), 954-964.

292. Suarez, P. A. Z.; Einloft, S.; Dullius, J. E. L.; de Souza, R. F.; Dupont, J., Synthesis and physical-chemical properties of ionic liquids based on 1- n-butyl-3-methylimidazolium cation. *J. Chim. Phys.* **1998**, 95, (7), 1626-1639
293. Kaar, J. L.; Jesionowski, A. M.; Berberich, J. A.; Moulton, R.; Russell, A. J., Impact of ionic liquid physical properties on lipase activity and stability. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, 125, (14), 4125-4131.
294. Xiao, C.; Rehman, A.; Zeng, X., Dynamics of redox processes in ionic liquids and their interplay for discriminative electrochemical sensing. *Anal. Chem.* **2012**, 84, (3), 1416-1424.
295. Fuller, J.; Carlin, R. T.; Osteryoung, R. A., The room temperature ionic liquid 1-ethyl-3-methylimidazolium tetrafluoroborate: electrochemical couples and physical properties. *J. Electrochem. Soc.* **1997**, 144, (11), 3881-3886.
296. Lee, S. H., Biocatalysis in ionic liquids: Influence of physicochemical properties of ionic liquids on enzyme activity and enantioselectivity; *citado por Cho y col. 2012*. In Pohang University of Science and Technology: Pohang, Korea. , 2005.
297. Kilaru, P.; Baker, G. A.; Scovazzo, P., Density and surface tension measurements of imidazolium quaternary phosphonium, and ammonium based room temperature ionic liquids: Data and correlations. *J. Chem. Eng. Data* **2007**, 52, (6), 2306-2314.
298. Zhao, H.; Baker, G. A.; Song, Z.; Olubajo, O.; Zanders, L.; Campbell, S. M., Effect of ionic liquid properties on lipase stabilization under microwave irradiation. *J. Mol. Cat. B: Enz.* **2009**, 57, (1-4), 149-157.
299. Pérez-Sánchez, M.; Cortés-Cabrera, Á.; García-Martín, H.; Sinisterra, J. V.; García, J. I.; Hernaíz, M. J., Improved synthesis of disaccharides with *Escherichia coli* β -galactosidase using bio-solvents derived from glycerol. *Tetrahedron* **2011**, 67, (40), 7708-7712.
300. D. van der Spoel, P. J. v. M., P. Larsson, and N. Tîmneanu, , Thermodynamics of hydrogen bonding in hydrophilic and hydrophobic media. *The Journal of Physical Chemistry B* **2006**, 110, 4393-4398.
301. Micaêlo, N. M.; Soares, C. M., Protein structure and dynamics in ionic liquids. Insights from molecular dynamics simulation studies. *The Journal of Physical Chemistry B* **2008**, 112, (9), 2566-2572.
302. Bastida, A.; Sabuquillo, P.; Armisen, P.; Fernández-Lafuente, R.; Huguet, J.; Guisán, J. M., A single step purification, immobilization, and hyperactivation of lipases via interfacial adsorption on strongly hydrophobic supports. *Biotech. Bioeng.* **1998**, 58, (5), 486-493.
303. Pedersen, N. R.; Wimmer, R.; Emmersen, J.; Degn, P.; Pedersen, L. H., Effect of fatty acid chain length on initial reaction rates and regioselectivity of lipase-catalysed esterification of disaccharides. *Carbohydr. Res.* **2002**, 337, (13), 1179-1184.

VII. ANEXOS